Roche

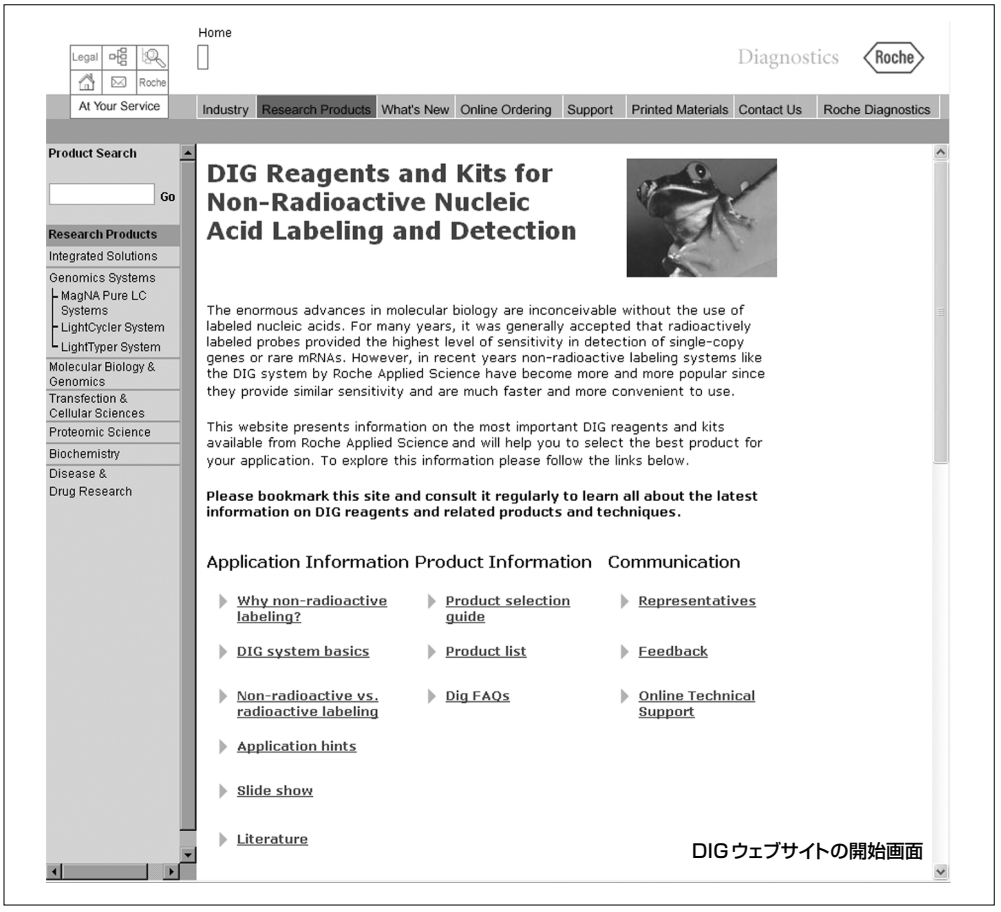
Roche Applied Science

DIG アプリケーション マニュアル
for Filter Hybridization

第２版

DIGシステム スペシャル・インターネットサイト

http://www.roche-applied-science.com/DIG



DIGウェブサイトの開始画面

◆ ロシュ・ダイアグノスティックス社のDIGシステムのアプリケーション, プロトコール, 試薬およびキットの詳細が載った, 新しいDIGウェブサイトを訪問してください.
このウェブサイトには次の内容のリンクがあります.

アプリケーション情報

▶ なぜ Non-RI 標識なのか?

Non-RIプローブが提供するすべての利点の概要をご覧ください.

▶ DIGシステムの基礎

ここではDIGシステムがどのように働くかがわかります.

▶ Non-RI 対 RI 標識

DIGプローブが,すべてのアプリケーションでRIプローブから置き換えられる事をデータでご覧ください.

▶ アプリケーションのヒント

どのキット・試薬の選択がベストかという事と, DIGシステムで成功するためのアプリケーションにおける重要なステップに対する, より深い情報をじっくりお読みください.

▶ スライドショー

このセクションの38スライドが, DIG標識プローブの基礎と応用をお教えします.

▶ 文　献

DIG標識産物のアプリケーションの文献をチェックしてください.

プロダクト情報

ロシュ・ダイアグノスティックス社のDIGラベリング & デテクション試薬の詳細をご覧ください.
アプリケーションに至適な製品の選択に必要な情報が記載されています.

日本でも独自のホームページを開設していますので, あわせてご活用ください.
日本語版ホームページ : http://www.roche-biochem.jp

DIG アプリケーション マニュアル

for Filter Hybridization

第２版

目　次

はじめに
DIG システムと
本マニュアルの紹介

DIGによるノンラジオアクティブな核酸のラベリングと
検出システムの概要 …… 2

DIGラベリング …… 3

ハイブリダイゼーションと検出 …… 4

DIGアプリケーションマニュアルの概要 …… 5

このマニュアルの利用方法 …… 6

このマニュアルの中から目的の操作方法を見つけ出すには …… 8

第１章：
DIG の基礎

1. はじめに …… 10

2. DIGベリング …… 11
2.1 DIGによるノンラジオアクティブなラベリング法の概要 …… 11
2.2 PCRラベリング法、ランダムプライムドラベリング法,
RNAラベリング法の比較 …… 13
2.2.1 PCRラベリング法について …… 13
2.2.2 ランダムプライムドラベリング法について …… 14
2.2.3 RNAラベリング法について …… 14
2.2.4 3通りのラベリング法における重要なパラメーターの比較…… 15

3. プローブのラベリング効率を評価する …… 16
3.1 直接検出アッセイの概要 …… 16
3.2 PCRラベルされたプローブのゲル電気泳動による解析 …… 18

4. ターゲット核酸をアガロースゲル電気泳動する …… 19
4.1 ゲルにロードするターゲット核酸の量 …… 19
4.2 アガロースゲルの調製と電気泳動 …… 19
4.2.1 アガロースゲルでのRNAの分離 …… 20
4.2.2 パルスフィールドゲル電気泳動 …… 20

5. ターゲット核酸をメンブレンへブロットトランスファーする …… 21
5.1 ブロッティングメンブレンについて …… 22

6. ターゲット核酸とプローブとのハイブリダイゼーション …… 23
6.1 ハイブリダイゼーション中でのDIGラベルされたプローブ濃度 …… 23
6.2 最適なハイブリダイゼーション温度の決定 …… 23
6.2.1 ストリンジェンシーに影響を与える三つの環境的な要素 …… 24
6.2.2 種類の違う核酸ハイブリッドがハイブリダイゼーション温度に与える影響 …… 24
6.2.3 シークェンスに関連する要素がハイブリダイゼーション温度に与える影響 …… 25
6.3 ハイブリダイゼーション用バッファーの組成 …… 25
6.3.1添加剤の作用…… 26
6.4 ハイブリダイゼーションの所要時間 …… 27

7. ブロットをストリンジェント洗浄する …… 28

8. プローブとターゲット核酸とのハイブリッドを検出する …… 29

9. メンブレンからのプローブの剥離とリプロービング …… 31

10.DIGラベリングおよび検出実験のための設備 …… 33

11.DIG製品セレクションガイド：ご自由にお選びください. …… 36

第 2 章：
ノンラジオアクティブな
ラベリングと
検出の方法

1. はじめに …… 40

2. ハイブリダイゼーション用プローブのDIGラベリングに関するテクニック … 41

2.1 ランダムプライムド法によるDNAプローブのラベリング(高収量の方法) …… 43
2.1.1 ランダムプライムドラベリングに必要な材料 …… 44
2.1.2 操作方法 …… 45
2.1.2.1 テンプレートの精製 …… 45
2.1.2.2 プローブのランダムプライムドラベリング …… 47
2.1.2.3 プローブの収量の決定 …… 47
2.1.2.4 次に行うこと …… 48
2.1.3 ランダムプライムドラベリングから最良の結果を得るために …… 49
2.1.3.1 ランダムプライムドラベリングにおける大切なヒント …… 49
2.1.3.2 ランダムプライムドラベリング法のトラブルシューティング …… 50
2.1.3.3 ラベルされたプローブを"きれい"にすることで，バックグラウンドを抑える …… 50
2.2 PCR法によるDNAプローブのラベリング …… 51
2.2.1 PCRラベリングに必要な材料 …… 52
2.2.2 操作方法 …… 53
2.2.2.1 プローブのPCRラベリング …… 53
2.2.2.2 ラベルされたプローブの合成を確認する …… 57
2.2.2.3 次に行うこと …… 58
2.2.3 PCRラベリングから最良の結果を得るために …… 58
2.2.3.1 PCRラベリングにおける大切なヒント …… 58
2.2.3.2 PCRラベリング法のトラブルシューティング …… 59
2.2.3.3 テンプレート濃度は，特異的なプローブを合成するための最も大切な要因である …… 60
2.2.4 PCRにより合成されるDIGラベルプローブを用いた代表的な実験結果 …… 61
2.3 トランスクリプションによるRNAプローブのラベリング …… 62
2.3.1 RNAプローブのラベリングに必要な材料 …… 63
2.3.2 操作方法 …… 65
2.3.2.1 テンプレートの精製 …… 66
2.3.2.2 トランスクリプションによるRNAプローブのラベリング …… 68
2.3.2.3 プローブの収量の決定 …… 69
2.3.2.4 次に行うこと …… 69
2.3.3 トランスクリプションによるラベリングから最良の結果を得るために …… 70
2.3.3.1 RNAプローブのラベリングにおける大切なヒント …… 70
2.3.3.2 RNAラベリング法のトラブルシューティング …… 71
2.3.4 DIGラベルされたRNAプローブを用いた代表的な実験結果 …… 72
2.4 オリゴヌクレオチドのDIGラベリング …… 73
2.5 直接検出法によりプローブの収量を概算する …… 75
2.5.1 直接検出法に必要な材料 …… 75
2.5.2 操作方法 …… 76
2.5.2.1 ラベルされたプローブの希釈系列を作成し，メンブレンへスポットする …… 77
2.5.2.2 スポット中のDIGを化学発光により検出する …… 78

第２章：

3. DIGラベルされたプローブをブロットへ
ハイブリダイズさせるテクニック …… 84

3.1 DNAプローブのサザンブロットへのハイブリダイゼーション …… 84
3.1.1 電気泳動，ブロッティング，ハイブリダイゼーションに必要な材料…… 85
3.1.2 操作方法…… 86
3.1.2.1 アガロースゲルでDNA試料を分離する …… 87
3.1.2.2 DNAをメンブレンへトランスファーする(サザンブロット，キャピラリートランスファー法)…… 87
3.1.2.3 DIG Easy Hybを用いたブロットのプレハイブリダイゼーション…… 89
3.1.2.4 DIGラベルされたDNAプローブとブロット上のDNAとをハイブリダイズさせる …… 90
3.1.2.5 次に行うこと …… 93
3.1.3 DIGラベルされたオリゴヌクレオチドプローブを用いて
サザンブロット上にあるターゲットDNAを検出するための方法 …… 93
3.2 RNAプローブのノーザンブロットへのハイブリダイゼーション …… 94
3.2.1 電気泳動，ブロッティング，ハイブリダイゼーションに必要な材料…… 95
3.2.2 操作方法…… 96
3.2.2.1 アガロースゲルでRNA試料を分離する…… 97
3.2.2.2 RNAをメンブレンへトランスファーする(ノーザンブロット，キャピラリートランスファー法) …… 98
3.2.2.3 DIG Easy Hybを用いたブロットのプレハイブリダイゼーション …… 99
3.2.2.4 DIGラベルされたRNAプローブとブロット上のRNAとをハイブリダイズさせる…… 101
3.2.2.5 次に行うこと …… 102
3.2.3 DIGラベルされたDNAプローブを用いてノーザンブロット上にある
ターゲットRNAを検出するための方法 …… 102
3.3 ブロットから最良の結果を得るために …… 103
3.3.1 電気泳動，ブロッティング，ハイブリダイゼーションに関する大切なヒント…… 103
3.3.2 ハイブリダイゼーションブロットに関するトラブルシューティング …… 105

4. ブロット上にハイブリダイズしたプローブを検出するテクニック ……106
4.1 化学発光法によるブロット上にハイブリダイズしたプローブの検出 …… 106
4.1.1 化学発光検出に必要な材料 …… 107
4.1.2 操作方法 …… 107
4.1.2.1 プローブとターゲット核酸とのハイブリッドを化学発光により可視化させる …… 108
4.1.2.2 次に行うこと …… 110
4.1.3 化学発光検出法のトラブルシューティング …… 110
4.1.4 化学発光検出アッセイを用いた代表的な実験結果 …… 113
4.2 発色法によるブロット上にハイブリダイズしたプローブの検出 …… 115
4.2.1 発色検出に必要な材料…… 116
4.2.2 操作方法…… 117
4.2.2.1 抗DIG抗体を用いてプローブとターゲット核酸とのハイブリッドの局在を検出する …… 117
4.2.2.2 NBT/BCIPを用いてプローブとターゲット核酸とのハイブリッドを可視化させる…… 119
4.2.2.4 次に行うこと …… 120
4.2.3 発色検出アッセイを用いた代表的な実験結果…… 121

第２章：

5. メンブレン上のプローブの剥離とリプロービングのテクニック ……122
5.1 プローブを剥離させる反応に必要な材料 …… 122
5.2 操作方法 …… 122
5.2.1 化学発光検出した後にDIGラベルされたDNAプローブを剥離する …… 123
5.2.2 NBT/BCIPを用いて発色検出した後にDIGラベルされたDNAプローブを剥離する …… 124
5.2.4 化学発光検出した後にDIGラベルされたRNAプローブを剥離する …… 124
5.2.5 次に行うこと …… 125

6. DIGラベルされたプローブの大容量スクリーニング・アプリケーション …125
6.1 DIGラベルされたプローブをコロニー/
プラークハイブリダイゼーションに使用する …… 126
6.1.1 コロニー/プラークハイブリダイゼーションに必要な材料 …… 126
6.1.2 操作方法 …… 129
6.1.2.1 コロニーまたはプラークリフトの調製 …… 129
6.1.2.2 DIGラベルされたDNAプローブをコロニー/プラークリフトにハイブリダイズさせる …… 132
6.1.2.3 化学発光アッセイを用いたプローブとターゲットDNAとのハイブリッドの検出(トランスバランシー法) … 133
6.1.2.4 発色アッセイを用いたプローブとターゲットDNAとのハイブリッドの検出 …… 134
6.1.3 コロニー/プラークハイブリダイゼーションに関する大切なヒント …… 134
6.1.4 DIGラベルされたプローブを用いたコロニー/プラーク
スクリーニングにおける代表的な実験結果 …… 135

第３章：

その他のノンラジオアクティブアッセイ

1.はじめに ……138

2. ノンラジオアクティブなウェスタンブロットアッセイ ……139
2.1 アッセイの概要 …… 140
2.2 ノンラジオアクティブなウェスタンブロットアッセイの代表的な実験結果 …… 142

3. ノンラジオアクティブなテロメアレングスアッセイ ……142
3.1 アッセイの概要 …… 144
3.2 ノンラジオアクティブなテロメアレングスアッセイの代表的な実験結果…… 145

4. ノンラジオアクティブなRNaseプロテクションアッセイ……146
4.1 アッセイの概要 …… 147
4.2 ノンラジオアクティブなRNaseプロテクションアッセイの代表的な実験結果 …… 148

5. ノンラジオアクティブなゲルシフトアッセイ ……149
5.1 アッセイの概要 …… 150
5.2 ノンラジオアクティブなゲルシフトアッセイの代表的な実験結果 …… 151

6.DIGラベルされたDNAを直接検出する……151
6.1 アッセイの概要 …… 152
6.2 PCR DIG Labeling Mixを用いた代表的な実験結果…… 153
6.3 PCR DIG Probe Synthesis KitおよびPCR DIG Labeling Mixを用いて
調製されたハイブリダイゼーションプローブの感度の比較 …… 153

付　録

付録 A：DIGの基礎のまとめ …… 156
1. DIGラベリング …… 156
2. 電気泳動とブロットトランスファー …… 157
3. プローブをターゲット核酸にハイブリダイズさせる …… 158
DNA：DNAハイブリッドに最適なハイブリダイゼーション温度の算出…… 159
オリゴヌクレオチドプローブに最適なハイブリダイゼーション温度の算出 …… 160
4. ブロットのストリンジェント洗浄 …… 160
低ストリンジェンシー洗浄 …… 160
高ストリンジェンシー洗浄 …… 160
5. アルカリホスファターゼ基質の感度 …… 161

付録 B：DIGシステムのトラブルシューティング …… 162
1. 発生しやすい問題と推奨される解決方法 …… 162
問題 1：シグナルが弱すぎる，またはシグナルが強すぎる …… 162
問題 2：メンブレン全体に高いバックグラウンドを生じる …… 163
問題 3：不均一な雲様のバックグラウンドを生じる …… 163
問題 4：不明瞭なしみ，粒状のバックグラウンドを生じる …… 164
問題 5：メンブレンの一部にのみ高いバックグラウンドを生じる …… 164
問題 6：スポット状のバックグラウンドを生じる …… 165
問題 7：バンドの上に灰色の円形の影を生じる …… 167
問題 8：メンブレンによってカバーされていない部分で，X-線フィルム上に
スポット状のバックグラウンドを生じる …… 167
問題 9：メンブレン上にバックグラウンドは見られないが、
レーンを横切るように非特異的なしみ状のシグナルが現れる …… 168
問題10：バンドが拡散する …… 168
問題11：バンドが見られない …… 169
問題12：ノーザンブロットで，非特異的なrRNAの
ハイブリダイゼーションシグナルが見られる …… 169
問題13：メンブレンに複合的なバックグラウンドや汚れを生じる …… 170

2. シングルコピー遺伝子の検出をより簡単に最適化するには …… 171

付録 C：DIGラベリングおよび検出結果を改善するには …… 174

付録 D：各種溶液の調製 …… 183

付録 E：ご注文情報とDIGシステムの製品一覧 …… 188

索　引 …… 195

はじめに

DIG システムと
本マニュアルの紹介

DIGによるノンラジオアクティブな核酸のラベリングと
検出システムの概要 …… 2
DIGラベリング …… 3
ハイブリダイゼーションと検出 …… 4
DIGアプリケーションマニュアルの概要 …… 5
このバージョンの最新情報 …… 6
このマニュアルの利用方法 …… 6
このマニュアルの中から目的の操作方法を見つけ出すには …… 8

DIGシステムと本マニュアルの紹介

DIGシステムは，核酸のノンラジオアクティブなラベリングと検出における，シンプルで効率の良いシステムです．ラジオアクティブなラベリングと検出テクニックと比較した場合，DIGシステムには次のような利点があります．

- ラベリングや検出がテクニック上，安全に行われます．
- ラベルされたプローブは安定で，少なくとも１年間は保存することが可能です．
- ハイブリダイゼーション溶液を，数回にわたり再利用することが可能です．

実際にDIGシステムを用いることでラジオアクティブなハイブリダイゼーションアッセイの利点（ラジオアクティブと同様のラベリングやハイブリダイゼーションのテクニック，高感度，低バックグラウンドなど）の全てを携えながら，欠点（有害物質，廃棄物処理の難しさ，長いアッセイ時間，ラベルされたプローブの不安定さなど）を克服することが可能です．上記の特性から，DIGシステムはハイブリダイゼーション実験を多く行う研究室（"ハイ・スループット"研究室）において理想的なシステムです．

DIGによるノンラジオアクティブな核酸のラベリングと検出システムの概要

DIGシステムがもつ適応性とパワーにより次のような実験を行うことが可能です：

- *アプリケーションに最適なハイブリダイゼーションプローブの選択．*
- *ジゴキシゲニン（DIG）を用いたDNA，RNA，オリゴヌクレオチドのラベルを行えること．*
- *扱い慣れた，効率のよい方法を用いてプローブを多様にラベルすること．*
  DIGラベリングのテクニックは，従来用いられてきた酵素法によるラベリング方法を採用したシンプルなものです．
- *希少なDNAあるいはRNAの検出に，DIGラベルされたプローブを使用すること．*
  DIGラベルされたプローブを用いることで，サザンブロット上でのシングルコピー遺伝子，ノーザンブロット上での希少なmRNA，細菌コロニーやウィルスプラーク中の希少な組換体，あるいは in situ における重要な核酸の検出を簡単に行うことが可能です．

シンプルで使いやすいDIGシステムが，これほどパワフルなツールである理由は何でしょう．それは，使い慣れた従来法の改良と，革新的なDIGの技術とをうまく組み合わせたところにあるのです．

DIGラベリング

DNA, RNAおよびオリゴヌクレオチドをジゴキシゲニン(digoxigenin; DIG)(図 1)を用いてラベルするプロトコールは, 確立され幅広く普及した方法に基づいています.

ラジオアクティブなプローブの調製に用いられる方法(酵素法が一般的)も, DIGラベルプローブの調製法として使用されます(図 2).

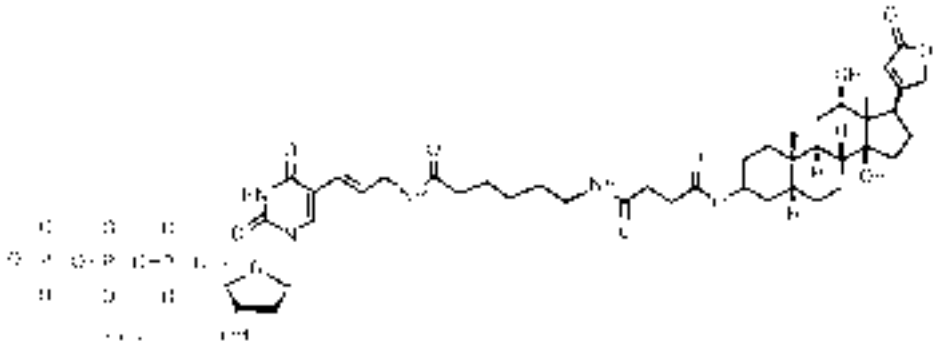


図1. アルカリに不安定なジゴキシゲニン(DIG)-dUTPの構造. このアルカリ不安定性DIG-dUTPは, ノンラジオアクティブなDNAラベリングのアプリケーションの大部分に使用されます. DIG DNAラベリングのキットの多くに, この化合物が含まれています. RNAやオリゴヌクレオチドのノンラジオアクティブなラベリングには, DIGラベルされた別のタイプのヌクレオチドが利用可能です.

Roche Diagnsticsは, 核酸にジゴキシゲニンを最適な間隔で効率よく取り込む製品群を開発, 完備しました. 製品群は次の通りです.

- **PCR DIG Probe Synthesis Kit,** PCRによりDIG-11-dUTPをDNAに取り込ませるためのキット.
- **DIG-High Prime と DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I および II,** ランダムプライムドラベリング法によりDIG-11-dUTPをDNAに取り込ませるためのキット.
- **DIG RNA Labeling Kit (SP6 / T7) と DIG Northern Starter Kit,** RNAポリメラーゼを介するトランスクリプションによりDIG-11-UTPをRNAに取り込ませるためのキット.
- **DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit,** オリゴヌクレオチドの 3'-末端にDIG-11-ddUTPを 1 分子だけ(ターミナルトランスフェラーゼにより)付加させるためのキット.
- **DIG Oligonucleotide Tailing Kit,** オリゴヌクレオチドの 3'-末端に一連のDIG-11-dUTPとdATPとを適宜(ターミナルトランスフェラーゼにより)付加させるためのキット.

さらに, 弊社ではニックトランスレーションやcDNA合成におけるDIG取り込みのための最適なプロトコールも開発しました.

ノート: DIGシステムのキットおよび試薬の全製品リストについては, 188ページの付録 Eを参照ください.

ハイブリダイゼーションと検出

ジゴキシゲニンラベルされたプローブをターゲット核酸(サザンブロット上のDNAやノーザンブロット上のRNA)にハイブリダイズさせるため，標準的なハイブリダイゼーションのプロトコール(図2)を採用しています．手法上の主な変更は，メンブレンを特製のブロッキング試薬で前処理をし，非特異的なバックグラウンドを除去する点のみです．

核酸ブロット上でのハイブリダイゼーションによるシグナルの検出(図2)において，DIGシステムはウェスタンブロット用に開発された免疫化学的な方法を採用しています．はじめに，ハイブリダイズしたプローブに，アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体が結合します．

それから，この抗体-プローブの複合体を，アルカリホスファターゼの発色または化学発光基質により可視化させます．発色基質は，メンブレン上に直接発色してシグナルを生じます．また，より感度の高い化学発光基質が発する光のシグナルは，X線フィルム(^{32}Pや^{35}Sラベルされたプローブに用いるものと同じ)やイメージャー(X-線フィルムを用いずに定性または定量解析が可能)により簡便に記録されます．

DIGラベルされたプローブの検出のために，以下の試薬や試薬セットをご利用ください．

- アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体，メンブレン上でDIGプローブとター ゲットとの複合体を検出するための抗体試薬．
- その他の標識抗DIG抗体(ペルオキシダーゼ標識，金標識，フルオレセイン標識およびローダミン標識抗DIG抗体を含む)；*in situ* アプリケーションにおいて，DIGプローブとターゲットとの複合体を検出するために適する．

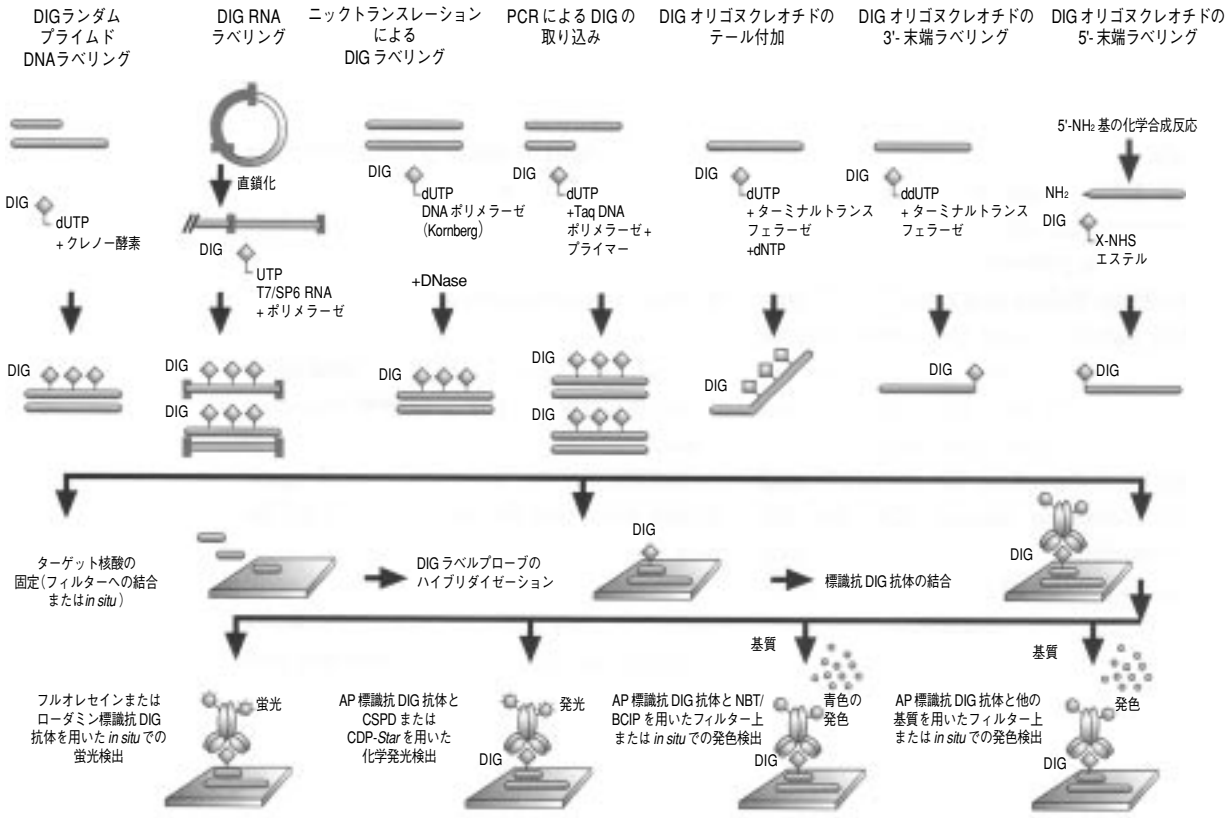


図2. DIG システムによるラベリングと検出

- **アルカリホスタファーゼ化学発光基質 CDP-*Star*, CSPD, および DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids,** DIGラベルされたプローブを，化学発光により高感度に可視化させるための試薬および試薬セット．
- 種々のアルカリホスファターゼ発色基質は，メンブレン上(プローブとターゲットとの複合体のある位置)に直接発色沈殿を生じさせます．

これらの試薬は，以下の通りです：

- **DIG Nucleic Acid Detection Kit,** NBTとBCIPを用いた簡便なキット．
- **アルカリホスファターゼ基質 HNPP**

ノート： DIGシステムの基質と抗体の全製品リストについては，188ページの付録Eを参照ください．

DIGアプリケーションマニュアルの概要

ノンラジオアクティブラベリングやメンブレンのハイブリダイゼーション実験のデザインや実践のための便利なリファレンスとして，本書DIGアプリケーションマニュアルを利用することが可能です．本書は，最もよく利用されるジゴキシゲニンのラベリング法やDIGラベルされたプローブをメンブレン上で検出するためのアルカリホスファターゼに基づくアッセイを，ステップごとに手引きしています．

本書は，以下の方法についても詳しく説明しています．

- ヒトのジェノミックサザンブロットにおけるシングルコピー遺伝子の検出
- ノーザンブロットにおける希少なmRNAの検出
- コロニーおよびプラークのスクリーニング
- cDNAのディファレンシャル・スクリーニングやアレイ・スクリーニング

また，本書はDIGシステムを用いたメンブレンハイブリダイゼーションにおいて，最良の結果を得るためのコツがたくさん盛り込まれています．例えば，最終的にハイブリダイゼーションに用いるプローブの正確な量を算定するため，「プローブの収量の評価」(75ページ，第2章)が設けられています．

ウェスタンブロット解析，テロメアアッセイ，RNaseプロテクションアッセイ，ゲルシフトアッセイやゲル上でのDIGラベルされたDNAの直接検出など，その他のノンラジオアクティブなアプリケーションについても，簡単な概要が本書に記載されています．これらのテクニックについては，本書の第3章を参照ください．

ノート： DIGシステムの *in situ* ハイブリダイゼーションへの使用については，本書に記載されていません．ノンラジオアクティブな *in situ* ハイブリダイゼーションのアプリケーションの処理全般については，"Non-RI *in situ* ハイブリダイゼーション応用マニュアル"をロシュ・ダイアグノスティックス社までご請求ください．

このマニュアルの利用方法

このマニュアルを最大限に活用するためには，本書を最初から，つまり第1章から読み始めてください．「DIGの基礎」では，プローブのラベリングからメンブレンからのプローブの剥離まで，DIGシステムを用いた実験操作における全てのステップについて概説されています．それぞれのステップにおいて，本書では以下のような内容を紹介しています．

- アプリケーションに応じて最適なDIGシステムのテクニックを選択するための情報．
- 最も高感度かつ低バックグラウンドの結果を得るための，実験パラメーター（テンプレートの濃度，ターゲットの濃度，基質，その他）のガイドライン．

第1章を読み終えれば，ラベリングと検出実験について，希望通りの結果を得るために正確にデザインすることができることでしょう．DIG製品セレクションガイド（第１章，36ページ）を利用して，必要なキットや試薬を選んでみましょう．実験システムをデザインしてしまえば，第２章にくわしく説明されているDIGラベリングおよび検出の操作に従い，実験を行うことができます（図３）．

Tip：必要な操作全てを直ちに見つけ出したい場合は，この「はじめに」の章末にある表「このガイドの中から目的の操作方法を見つけ出すには」をご利用ください．

図 3. DIGラベリングおよび検出実験を行うためのフローチャート

このマニュアルの中から目的の操作方法を見つけ出すには

操作のテクニック	このマニュアルのどこに記載されているか 章	セクション	ページ
DNAのラベリング			
ランダムプライムドラベリング	2	2.1.2	45
PCRラベリング	2	2.2.2	53
ニックトランスレーション	—	ノート1参照	—
RNAのラベリング			
*In vitro*トランスクリプション	2	2.3.2	65
オリゴヌクレオチドのラベリング			
3'末端ラベリング	2	2.4	73
3' テーリング	2	2.4	73
ラベルされたプローブの収量算出			
直接検出	2	2.5.2	75
ゲル電気泳動	2	2.2.2.2	57
プローブのターゲットへのハイブリダイゼーション			
サザンブロット	2	3.1.2	87
DNAドットブロット	2	3.1.2	87
ノーザンブロット	2	3.2.2	98
RNAドットブロット	2	3.2.2	98
コロニー/ プラークハイブリダイゼーション	2	6.1.2	129
cDNAのディファレンシャル・スクリーニング	2	6.2.2	145
cDNAのアレイ・スクリーニング	2	6.2.2	146
In situ ハイブリダイゼーション	—	ノート1参照	—
プローブとターゲットとのハイブリッドの検出/可視化			
化学発光法によるアッセイ	2	4.1.2	107
NBT / BCIPを用いた発色法によるアッセイ	2	4.2.2.2	119
メンブレンからのプローブ剥離とリプロービング			
化学発光法によるアッセイ後のDNAブロット	2	5.2.1	123
発色法によるアッセイ後のDNAブロット	2	5.2.2	124
化学発光法によるアッセイ後のRNAブロット	2	5.2.3	124
その他のテクニック			
バックグラウンドを最小限に抑える "モック・ ハイブリダイゼーション"	付録 B	2	172
メンブレンに生じるバックグラウンドの トラブルシューティング	付録 B	1	162
実験結果を改善するためのその他の操作方法	付録 C	—	174

ノート1: 本書では操作方法は詳説されていません.
これらの内容については, "Nonradioactive *In Situ* Hybridization Application Manual"に記載されています.
ロシュ・ダイアグノスティックス社まで Non-RI *in situ* ハイブリダイゼーション応用マニュアルをご請求ください.

第 1 章：
DIGの基礎

1. はじめに …… 10

2. DIGラベリング …… 11
2.1 DIGによるノンラジオアクティブなラベリング法の概要 …… 11
2.2 PCRラベリング法，ランダムプライムドラベリング法，RNAラベリング法の比較 13

3. プローブのラベリング効率を評価する …… 16
3.1 直接検出アッセイの概要 …… 16
3.2 PCRラベルされたプローブのゲル電気泳動による解析 …… 18

4. ターゲット核酸をアガロースゲル電気泳動する …… 19
4.1 ゲルにロードするターゲット核酸の量 …… 19
4.2 アガロースゲルの調製と電気泳動 …… 19

5. ターゲット核酸をメンブレンへブロットトランスファーする …… 21
5.1 ブロッティングメンブレンについて …… 22

6. ターゲット核酸とプローブとのハイブリダイゼーション …… 23
6.1 ハイブリダイゼーション中でのDIGラベルされたプローブ濃度 …… 23
6.2 最適なハイブリダイゼーション温度の決定 …… 23
6.3 ハイブリダイゼーション用バッファーの組成 …… 25
6.4 ハイブリダイゼーションの所要時間 …… 27

7. ブロットをストリンジェント洗浄する …… 28

8. プローブとターゲット核酸とのハイブリッドを検出する …… 29

9. メンブレンからのプローブの剥離とリプロービング …… 31

10. DIGラベリングおよび検出実験のための設備 …… 33

11. DIG製品セレクションガイド：ご自由にお選びください． …… 36

1. はじめに

DIGノンラジオアクティブシステムは，核酸のラベリングや検出における，きわめてパワフルかつ高感度な方法をもたらします．この章では，DIGラベルされたハイブリダイゼーション用プローブ(DNA，RNAやオリゴヌクレオチド)を生成することや，それらのプローブを用いてメンブレン上(サザン，ノーザン，またはドットブロット)でターゲット核酸(RNAまたはDNA)を検出することに関連した，異なるいくつかの方法の概要を説明します．この章における「DIGの基礎」の情報は，DIGラベリングおよび検出システムのデザインや改善の手助けとなるでしょう．DIGシステムのそれぞれのステップを実施するに当たり，最良の方法が決まれば，このマニュアルの第2章へ進み，それぞれのステップの詳しい操作方法やコツをひもといてください．

ノート：このマニュアルの付録A, 156ページに，便利な「DIGの基礎」の早見表(クイックリファレンス)を盛り込みました．
DIGシステムのデザインに必要な情報の概要を手早くチェックするためにご利用ください．

このセクションのトピック：

トピックの情報		セクション	ページ
DNAラベリング	⇒	2	11
プローブのラベリング効率の評価	⇒	3	16
ターゲット核酸をアガロースゲル電気泳動する	⇒	4	19
ターゲット核酸をメンブレンへブロットトランスファーする	⇒	5	21
ターゲットへのプローブのハイブリダイゼーション	⇒	6	23
ブロットのストリンジェント洗浄	⇒	7	28
プローブとターゲットとのハイブリッドの検出	⇒	8	29
メンブレンからのプローブ剥離とリプロービング	⇒	9	31
DIGラベリングおよび検出のための設備	⇒	10	33
DIG製品セレクションガイド	⇒	11	36

2. DIGラベリング

このセクションでは，目的に応じて最良のラベリング法を選択するためにデザインされています．このセクションには以下の内容が盛り込まれています．

- 実用されている多くのラベリング方法について，必要なテンプレート量，生成されたプローブの感度，プローブに適したアプリケーション，およびそれぞれの方法のためにデザインされたロシュ・ダイアグノスティックス社のラベリングキットや試薬を一覧表にまとめました．

ノート： 多様なDIGラベリング法を最適化させるためのテクニックが開発されてきました．ラベリングの操作における最適化や操作方法の詳細な情報については，表の一番右側の列に記載されているページをご参照ください．

- 一般的に使用されているPCRラベリング，ランダムプライムドラベリング，RNAラベリングの3通りのラベリング方法を比較しています．この表を利用して3通りの主なラベリング方法を比較しながら，それぞれに合った方法を選ぶことが可能です．

2. 1 DIGによるノンラジオアクティブなラベリング法の概要

操作方法（弊社から発売されているキット）	方法上の利点	初めに必要とされるテンプレート量	ラベルされたプローブの感度（検出限界）	ラベルされたプローブの用途	注意点	操作方法の詳細については，以下のページへ
PCRラベリング（PCR DIG Probe Synthesis Kit, Cat.No.1636090）	● 必要とされるテンプレートは少量でよい． ● 精製されていないテンプレートでも使用可能である． ● 他の方法に比べ，最適化させる必要性が少ない． ● ラベルされたプローブの収量が高い． ● 非常に短いプローブ（<100 bp）の調製に推奨される． ● 非常に感度の高いプローブを合成する．	● プラスミドDNA，10～100 pg（10 pgの使用が理想的） ● ジェノミックDNA,1～50 ng（10 ngの使用が理想的）	0.10～0.03 pg DNA	●ジェノミックサザンブロット ● ノーザンブロット （ライブラリーのスクリーニング，ドット/スロットブロット，および *in situ* ハイブリダイゼーションにも使用可能）	● ラベリング反応を試みる前にDIG-dUTP非存在下でを最適化する． ●高感度のプローブを合成するには，テンプレートの濃度が重要となる． ● 長い（>1kb）プローブのラベリングでは，DIGの使用量を減らす． ● PCR DIG Labeling Mix（DIG-dUTP: dTTP =1: 20）をキット中のラベリングミックス（DIG-dUTP: dTTP= 1: 3）の代わりに使用しないこと．	51（第2章） ***ノート：*** この方法と他のラベリング方法との比較については，この章の13ページを参照ください．

DIGによるノンラジオアクティブなラベリング法の概要

操作方法（弊社から発売されているキット）	方法上の利点	初めに必要とされるテンプレート量	ラベルされたプローブの感度（検出限界）	ラベルされたプローブの用途	注意点	操作方法の詳細については，以下のページへ
高収量ランダムプライムドラベリング [DIG-HighPrime DNA Labeling and Detection Starter Kits I （Cat. No.1 745 832） and II （Cat. No.1 585614）]	● 非常に感度の高いプローブを合成する． ● 反応量を10倍までスケールアップすることが可能．	● 300 ng DNA（シングルコピー遺伝子を検出するために必要なプローブ量として） ● ラベリング反応をオーバーナイトで行う場合，テンプレートの量を低くすることができる．	0.10〜0.03 pg DNA	● ジェノミックザサンブロット ● ライブラリーのスクリーニング（ドット/ スロットブロットやノーザンブロットにも使用可能）	● 高度に精製されたテンプレートが必要． ● テンプレートの不純度にとても影響を受ける． ● 精製したテンプレートは，H_2O またはTrisバッファー中に再懸濁させる．EDTAがラベリング反応を阻害するので，TEは使用しないこと．	43（第 2 章） ***ノート：*** この方法と他のラベリング方法との比較については,この章の13ページを参照ください．
ニックトランスレーション	● プローブの長さを調整することができる（*in situ* ハイブリダイゼーションのアプリケーションでは重要）．	1 μg DNA	主に*in situ* のアプリケーションで使用される；感度はターゲットのシステムに依存する．	● *in situ* ハイブリダイゼーション	● 高度に精製されたテンプレートが必要． ● ラベルする前にテンプレートを熱変性させる必要がない．	—
RNAラベリング [DIG Northern Starter Kit, Cat. No. 2039 672]	● 多量のプローブを合成する． ● ラベルされたプローブには,ベクターの塩基配列が一切含まれない． ● 1本鎖RNAプローブ ● ノーザンブロットの解析において,RNAプローブはDNAプローブより感度が高い． ● DIGラベルされたRNAプローブは, 容易に*in situ* ハイブリダイゼーション用に断片化される．	● 直鎖状のプラスミドDNA；1 μg ● プロモーターを含むPCR産物；100〜200 ng	0.10〜0.03 pg DNA 0.10〜0.03 pg RNA	● ノーザンブロット ● *in situ* ハイブリダイゼーション ● ライブラリーのスクリーニング ● ドット/ スロットブロット	● 高度に精製されたテンプレートが必要．	62（第 2 章） ***ノート:*** この方法と他のラベリング方法との比較については, この章の13ページを参照ください．
3' 末端ラベリング [DIG Oligonucleotide 3' End Labeling Kit, 2nd generation Cat. No.3 353 575]	● 必要とされるテンプレートは少量でよい． ● 必要に応じて反応をスケールアップすることが可能．	100 pmol オリゴヌクレオチド	10 pg DNA	● ライブラリーのスクリーニング ● ドット/ スロットブロッティング ● *in situ* ハイブリダイゼーション	● オリゴヌクレオチドはHPLCまたはElutips（Schleicher and Schuell社）により精製することが必要． ● プローブは，精製せずに使用することが可能．	73（第 2 章）
3' テーリング [DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd generation Cat. No.3 353 583]	● 必要とされるテンプレートは少量でよい． ● 末端ラベリングよりも高感度のプローブが得られる． ● 必要に応じて反応をスケールアップすることが可能．	100 pmol オリゴヌクレオチド	1 pg DNA	● ライブラリーのスクリーニング ● ドット/ スロットブロッティング ● *in situ* ハイブリダイゼーション	● オリゴヌクレオチドはHPLCまたはElutips（Schleicher and Schuell社）により精製することが必要． ● プローブは, 精製せずに使用することが可能．	73（第 2 章）

2. 2 PCRラベリング法,ランダムプライムドラベリング法, RNAラベリング法の比較

このセクションでは，PCRラベリング，ランダムプライムドラベリング，RNAラベリングの類似点と相違点とを概説します．

このセクションの情報は，ハイブリダイゼーションに使用するプローブにDIGを付加させる3通りの一般的な方法から，それぞれの目的にあったものを選ぶのに役立つでしょう．

3 通りのラベリング方法の原理

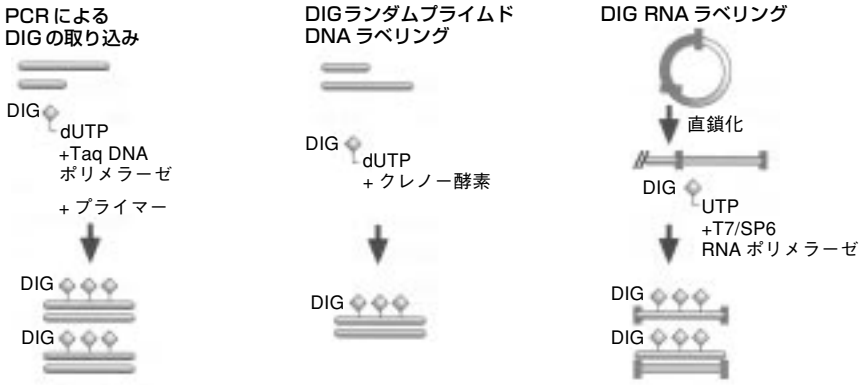


図 4. PCRラベリング，ランダムプライムドラベリング，RNAラベリング

2. 2. 1 PCRラベリング法について

PCRにおいて，耐熱性ポリメラーゼ(Taqポリメラーゼなど)は特異的なDNAターゲットを短時間に100万倍に増幅させることが可能です．反応混合液にDIG-dUTPが含まれれば，増幅されるDNAはラベル効率，特異性および感度の非常に高いハイブリダイゼーション用プローブになります．このPCRラベリング反応の特異性は，特にシークェンスの短いターゲットに適したラベリングのテクニックをもたらします．

PCRラベルされたプローブは，シングルコピー遺伝子のジェノミックサザンブロットでの検出や希少なmRNAのノーザンブロットでの検出に特に適しています．また，これらのプローブはライブラリーのスクリーニング，ドット/スロットブロット，*in situ* ハイブリダイゼーションにも使用することができます．

PCRラベリングは，非常に少量のテンプレートからラベルされたプローブを高収量に生成します．PCRラベリングにおけるテンプレートの最少量と最大量の範囲は，プラスミドで10〜100 pg，ジェノミックDNAで1〜50 ngです．しかし，当社の実験からプラスミドでわずか10 pg，ジェノミックDNAで10 ngから，最適な結果が得られることが示されています．一般的に，プラスミドに挿入したクローンDNAの方が，ジェノミックDNAよりも良好な結果をもたらします．PCRプライマーのシークェンスが，増幅されラベルされる領域を決定します．つまり，テンプレートの調製のクオリティーは，通常PCRラベリング反応に影響しません．クルードな精製状態のプラスミド試料(ボイリングによる精製など)でも，使用することができる場合があります．これはまた，PCRラベリングでは他のラベリング方法に比べて諸条件を最適化させる必要が少ないことを意味します．

2. 2. 2 ランダムプライムドラベリング法について

ランダムプライムドラベリングは，ほとんどあらゆる長さのテンプレートをラベルすることが可能です．

ノート：非常に短いシークェンスには，PCRラベリング法(前述のセクション2. 2. 1)を使用してください．

ランダムプライムドラベリングでは，ヘキサマー(6量体)のプライマーとアルカリに不安定なDIG-dUTP存在下でクレノー酵素がDNAテンプレートを複製します．この酵素は平均20〜25ヌクレオチドの伸長ごとに1分子のDIGを挿入していきます．
結果として得られるラベル産物は，均等にラベルされた高感度のハイブリダイゼーション用プローブ(最少0.10〜0.03 pgのターゲットDNAを検出することが可能)です．

ノート：DIG分子が間隔を開けて取り込まれることはとても重要です．DIG分子どうしが接近していると，立体障害により高分子の抗DIG抗体によるラベルされたプローブの認識と結合を妨げることになります．

ランダムプライムド法でラベルされたプローブは，ジェノミックサザンブロットにおけるシングルコピー遺伝子の検出や，リコンビナントのライブラリーのスクリーニングに特に適しています．また，ドット/スロットブロットやノーザンブロットにも使用することができます．
それぞれのプライマーは異なる6塩基のシークェンスをもつため，ラベルされたプローブ産物は，実際は多様な長さをもつフラグメントの集まりということになります．したがって，ラベルされたプローブはゲル上では特定のバンドというよりもスメアに現れます．ラベルされたプローブの長さの分布は，もとになったテンプレートの長さに依存します．

例：2 kbのテンプレートから生成されるラベルされたフラグメントは，およそ300〜1500 bpの範囲にあり，その大部分はおよそ800 bpの長さになります．PCRラベリングと異なり，ランダムプライムドラベリングでは高度に[High Pure Plasmid Isolation Kit (Cat. No. 1 754 777または1 754 785)や密度勾配(CsCl)遠心分離法により]精製されたテンプレートが必要とされます．

2.2.3 RNAラベリング法について

ラベルされたRNAプローブは，直鎖状にしたDNAテンプレートから*in vitro*トランスクリプションにより生成されます．トランスクリプションの間に，DNAテンプレートのコピーであるRNAが多く合成され，それぞれがDIG-UTPによりラベルされます．
RNAラベリング反応によるプローブの収量は大変高く，ラベルされたシークェンスは特異的でラベル効率も高いです．
この特異的なテンプレートのシークェンスは，ウィルスのプロモーター(T7，SP6, T3 RNAポリメラーゼなど)の下流に存在する必要があります．テンプレートは高度に精製された直鎖状のDNAあるいは増幅中に適切なプロモーターを付加させたPCR産物のどちらも使用できます．ラベルされたRNAプローブの感度はとても高いです．
事実，RNAターゲットの検出においてDIGラベルされたRNAプローブは，DIGラベルされたDNAプローブに比べて高い感度を示します．したがって，RNAプローブはノーザンブロット上での希少なmRNAの検出に特に適しています．また，サザンブロットやライブラリーのスクリーニング，ドット/スロットブロットや*in situ*ハイブリダイゼーションにも使用することができます．

2. 2. 4 3 通りのラベリング法における重要なパラメーターの比較

パラメーター	PCRラベリング	ランダムプライムドラベリング	RNAラベリング
シングルコピー遺伝子を検出するプローブを合成するために必要なテンプレート量	● 10 pg プラスミドDNA ● 10 ngジェノミックDNA	● 300 ng〜1 μg ジェノミックDNAまたはプラスミド	● 1 μgの直鎖状DNA ● 100〜200 ngのプロモーターを付加したPCR産物
最良の結果を得るために推奨されるテンプレート	● 未精製のクローンされたプラスミドのインサート["クイック調製"法（mini-prepsやmaxi-preps）や,単に細胞をボイリングして調製されたプラスミドでも使用することができる.]	● 高度に精製されクローンされたプラスミドのインサート（High Pure Plasmid Isolation Kit, Cat. No. 1 754 777を用いるか, 塩化セシウム存在下で密度勾配遠心分離によりプラスミドを調製することが望ましい.）	● 特別に調製され精製されたPCR産物（SP6, T3またはT7 RNAプロモーターを必ず含む）. ● 調製試料には, EDTAやRNaseが含まれないこと. ● 最適なテンプレートの長さは0.3〜1.0 kbである. ● テンプレートは必ず制限酵素を用いて直鎖状にし, 5'突出末端を有すること. ● テンプレートは，制限酵素処理の後,必ずフェノール / クロロフォルム抽出し,RNaseを除去すること.
必要とされるテンプレートの精製度	● 低い	● 高い	● 高い
DIG-dUTP : dTTPの最適な比率	● 1：3（< 1 kbの長さのプローブ用） ● 1：6（1 〜 3 kbの長さのプローブ用） ● 1：6 〜 1：10（> 3 kbの長さのプローブ用）	● 1：3	● 1：3
ラベルされた産物の長さ	●（プライマーに依存し）特異的	●（もとのテンプレートの長さに依存し）多様	●（プロモーターおよび末端サイトに依存し）特異的
ラベルされた産物の性質	● ラベルされた特異的なDNA. 多量のコピー数.	● 多様にラベルされたDNA. もとのテンプレートのフラグメントから転写されたもの.	● ラベルされた特異的なRNA. 多量のコピー数.
ラベルされたプローブの感度	● 0.10〜0.03 pg DNA	● 0.10〜0.03 pg DNA	● 0.10〜0.03 pg RNAまたはDNA

結論：DNAにDIGをラベルする最も融通が効いてパワフルな方法は, PCRラベリングです. 特に高度に精製されたテンプレートがない場合に有用です.
ランダムプライムドラベリングは，高度に精製されたテンプレートが充分にある場合に同様の感度を有するプローブを合成します. DIGラベルされたRNAは, ターゲットのRNAを検出する上で最も高い感度を示します.

3. プローブのラベリング効率を評価する

DIGラベルされた産物量を決定することにより，それぞれのラベリング反応の効率を確認することは重要です．これにより，ハイブリダイゼーション溶液に適切な量のプローブを加えることができます．ハイブリダイゼーションにおいて間違った量のプローブを使用した場合，厳しい結果につながることになります．

プローブの量が多すぎると，深刻なバックグラウンドの問題が生じます．プローブの量が少なすぎると，ハイブリダイゼーションのシグナル微弱，あるいはシグナルがでないという結果につながります(詳細については，付録 B，171ページ，Part 2 を参照ください)．

下の表は，異なる調製方法によりラベルされたプローブの量を評価するために推奨されるテクニックを示したものです．

ラベルされた産物に対して推奨される評価方法

ラベリングの方法	推奨される評価のテクニック
ランダムプライムドラベリング	直接検出法
PCR	ゲル電気泳動
ニックトランスレーション	直接検出法
RNAプローブ	直接検出法[1]
3' 末端ラベリング(オリゴヌクレオチド)	直接検出法
3' テーリング（オリゴヌクレオチド）	直接検出法

1 RNAプローブは，ゲル電気泳動により完全な状態で評価試験することができるが，定量することはできない．

3. 1 直接検出アッセイの概要

ラベルされた核酸プローブのほぼ全般(PCRラベルされたプローブを除く)を，おおまかに定量するために好ましい方法は直接検出法です．この方法は，DIGラベルされたプローブの希釈系列を調製し，メンブレン上に直接スポットして標準的なDIG検出法により可視化させるというものです(図 5)．

比較のため，既知の濃度のDIGラベルされたコントロール核酸を同じメンブレン上にスポットします．

ノート：DIGラベルされたコントロールの一覧は，第 2 章，75ページのセクション 2.5 を参照ください．

ステップ[1]	操作上ともに使用する溶液[1]	所要時間
① プローブとコントロールをナイロンメンブレン上にスポットする.	ラベルされたプローブと既知濃度のコントロール核酸の希釈系列	15分
② メンブレンを手短に洗う.	洗浄バッファー(Washing Buffer)	2分
③ メンブレンをブロッキングする.	1×ブロッキング溶液(Blocking Solution)	30分
④ メンブレン上のDIGラベルに抗体を結合させる.	アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体を,1×ブロッキング溶液に1：10,000希釈	30分
⑤ 結合しなかった抗体を取り除くため，メンブレンを2回洗う.	洗浄バッファー(Washing Buffer)	2×15分
⑥ メンブレンを平衡化する.	検出バッファー(Detection Buffer)	2分
⑦ メンブレンをバッグに入れ，化学発光試薬を加えてバッグをシールする.	Ready-to-useのCSPDまたはCDP-*Star*[2]	5分
⑧ (オプション) プレインキュベーション/CSPDの活性化	Ready-to-useのCSPD (CDP-*Star* には必要なし)	(10分)
⑨ シールしたバッグをイメージャーまたはX-線フィルムに感光させる.	ー	5～25分
	全所要時間：2.0時間 (CDP-*Star*) 2.5時間 (CSPD)	

1 これらのステップや溶液の詳細については，第2章，76ページのセクション2. 6を参照.
2 この操作では化学発光基質の代わりにNBT/ BCIPを用いて行うこともできる. DIG Starter Kit Iを参照.

図 5. 直接検出法の操作のフローチャート

0.1 pg量のプローブを含むスポットのシグナルが見られれば(図6)，そのプローブは十分な感度に達していることになります. そのラベリング反応により，最適な収量のラベルされたプローブが生成されたことになります.

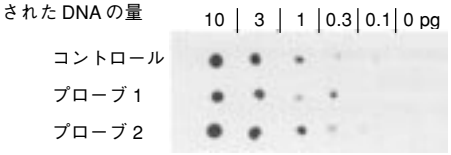


図 6. 直接検出法の結果.
ランダムプライムドラベリングにより，2種類の異なるDIGラベルされたプローブを調製した(それぞれ1 μgのテンプレートから). それぞれの希釈系列をナイロンメンブレン上にスポットし，直接検出法による解析を行った.
参考のため，DIGラベルされたコントロールDNAの希釈系列を同じメンブレンにスポットした. アルカリホスファターゼの化学発光基質(CDP-*Star*)を使用し，それぞれのスポットにおけるDIGのシグナルを可視化させた. 露光時間は10分. それぞれのスポットにおけるDIGラベルされたDNA量(もとのテンプレートからの推定量)を図の上に示した.

結果と結論：それぞれのDNAにおいて，0.3 pgのスポットが見られます. しかし，0.1 pgのスポットについて十分にDIGラベルが検出されたのはプローブ2とコントロールのみです.
したがって，プローブ2は十分な感度に到達しています. このプローブは(操作上で推奨される濃度において)，例えばジェノミックサザンブロット上のシングルコピー遺伝子を検出するために使用することが可能です. プローブ1もジェノミックサザンブロット上のシングルコピー遺伝子を検出することのできる感度を有していますが，ハイブリダイゼーション1回当たりラベルされたプローブをより多く使わなければならないことになります.

3. 2 PCRラベルされたプローブのゲル電気泳動による解析

PCRラベルされたプローブのラベリング効率を，直接検出法を用いずに決定することができます．ゲル電気泳動を代用することによりラベリング効率をすばやく推定することが可能です．ゲル電気泳動については以下に説明します．ゲル上におけるPCRラベルされたプローブの評価は，直接検出法による評価に比べて所要時間が明らかに短くなります．

ノート： このゲル電気泳動アッセイの詳説については，第 2 章, 85ページを参照ください．

実際にPCRにより生成したプローブのラベリング効率を推定するには，ラベルされていないバージョンの実験プローブを生成する反応も含めておく必要があります(DIG-dUTP非存在下での増幅反応など)．

それぞれのPCR産物(ラベルされていない実験プローブとDIGラベルされた実験プローブの両方)から一定量(5 μl)をミニゲルで電気泳動します．ゲルを臭化エチジウムで染色する際(図7)，以下のことに注意してください．

1. DIGラベルされたプローブは，ラベルされていないプローブよりも見ため明らかに分子量が大きいはずです．
   ノート： DNA中にDIGが存在すると，同じサイズのラベルされていないDNAの断片に比べて，ゲル中での移動が遅くなります．
2. ラベルされていないプローブDNAは，予想される分子量に応じて移動するはずです．
3. DIGラベルされたプローブは，ラベルされていないプローブDNAと染色の強度が同等(あるいはやや弱め)であるはずです．
4. 反応混合液中にDIGが存在すると，ポリメラーゼ反応が遅くなり，反応におけるラベリング効率が減少します．

これらの条件に適合しているようであれば，そのプローブは効率よくラベルされていると言えます．つまり，ラベルされたプローブの標準的な量(ハイブリダイゼーション用バッファー 1 ml 当たりPCR産物 2 μl)をハイブリダイゼーションに使用することができます．

DIGラベルされた分子量マーカー(ロシュ・ダイアグノスティックス社より発売)を同じゲル上に泳動すれば，DIGラベルされた実験プローブの量を以下の面から概算することが可能です．

- ラベルされた実験プローブと類似したサイズの分子量マーカーのバンドとの染色強度の対比
- ゲル上でのマーカーバンドの量(既知)

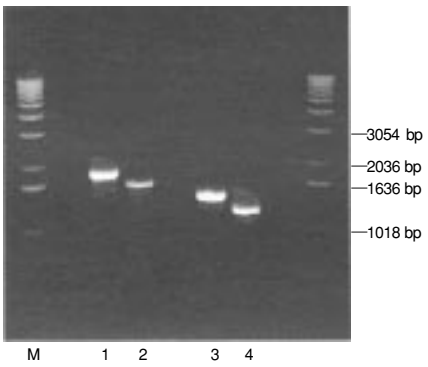


図 7. アガロースゲル電気泳動によるPCRラベルされたプローブの評価. このアガロースゲル上から，ラベルされたPCR産物の方がラベルされていない産物よりもはるかに大きな分子量であることがわかる.(これは，DIGを用いた高密度ラベリングによる.)
レーン 2 と 4： ラベルされていないPCR産物
レーン 1 と 3： それぞれ対応するDIGラベルされたPCR産物
M： 分子量マーカー

結果と結論： ラベルされたバンドとラベルされていないバンドとは，電気泳動ゲル上でまるで独立したバンドのように移動します．このような分子量のシフトが見られ，かつラベルされたバンドとラベルされていないバンドとの強度が同等(あるいはラベルされたものがやや弱い)であれば，そのラベリング反応はうまくいったと言えます．ラベルされたプローブを標準的な量(ハイブリダイゼーション用バッファー 1 ml当たりPCR産物 2 μl)をハイブリダイゼーション実験に使用することができます．

4. ターゲット核酸をアガロースゲル電気泳動する

DIGラベルされたプローブは，ブロット（サザンブロットやノーザンブロットなど）上における特異的な核酸シークェンスの検出に最もよく用いられます．最良の結果を得るには，ターゲット核酸が最適な条件によりアガロースゲル電気泳動により分離され，ブロットされる必要があります．

このセクションでは，核酸の電気泳動による分離を最適にするためのガイドラインを概説します．ブロッティングのプロセスを最適にする方法については，続くセクションで説明します．

4. 1 ゲルにロードするターゲット核酸の量

アガロースゲルにロードする核酸の量を決定するために，以下の表を代表的な実験例のガイドラインとして用いてください．

電気泳動ゲルにロードするターゲット核酸の量

ゲルにロードするターゲット核酸	ターゲット核酸の量（試料ごと，レーン当たり）	使用するプローブ
● ジェノミックDNA ● プラスミドDNA	1.0, 2.5, 5.0 μg（3通り別々の試料） < 1 ng	DIGラベルされたDNAまたはRNA
● トータルRNA ● mRNA	● ≦ 1 μg ● ≦ 100 ng	DIGラベルされたRNA
● トータルRNA ● mRNA	● ≦ 5 μg ● ≦ 500 ng	DIGラベルされたDNA

4. 2 アガロースゲルの調製と電気泳動

ゲルの調製と電気泳動の全般について，以下のガイドラインに従ってください．

- ゲルは全て使用する直前に新しく調製してください．
- 薄いゲルを使用する際は，ゲル板にゲル溶液を流し込んでから1時間以内に電気泳動を行ってください．
  注意： 薄いゲルは，1時間以上置くと乾燥作用を受けます．
- ゲルに臭化エチジウムを加えないでください．十分な時間をかけて電気泳動を行わない場合，臭化エチジウムが不均一なバックグラウンドを生じることがあります．

ノート： 電気泳動が終わった後，ゲルを1 μg/mlの臭化エチジウムで染色し，水（ゲル中にRNAが存在する場合はRNase-freeの水）で脱色して，ターゲット核酸が完全な状態にあることを確認します．ゲルに関する詳細については，付録Cのトピック3を参照ください．

4. 2. 1 アガロースゲルでのRNAの分離

RNA用のゲルには，さらに特別の注意が必要です．以下のガイドラインに従ってください．

- ●実験エリアがRNaseに汚染されることを防ぐため，以下の処理を行ってください：
- ◆実験操作中は，常に手袋を着用してください．
- ◆全てのガラス器具を使用前に加熱滅菌（bake）してください．
- ◆汚染除去用の溶液を用い，ゲルの調製を行う実験台エリア全体をふき取ってください．
- ●ゲルの調製に使用する溶液は全てRNaseフリーである必要があります．RNaseフリーの試薬を購入するか，試薬をDMDC（ジメチルジカーボネート；dimethyl-dicarbonate）またはDEPC（ジエチルピロカーボネート；diethyl pyrocarbonate）で処理し，RNaseの混入を除去します．

ノート： グリセロールからのRNase除去の処理を完全にすることは難しいため，RNaseフリーのグリセロールを購入している場合でも，試料用ローディングバッファー中にはグリセロールを加えないでください．

注意：市販の試料用ローディングバッファーに含まれるグリセロールはRNaseフリーであるとは限りません．

- ●RNAの分離において最良の結果を得るためには，試料のローディングバッファーからグリセロールを省き，以下のドライロード法を用いてゲル電気泳動を開始します：
- ◆グリセロールを含まない試料用バッファーを調製します．組成は，変性剤，バッファーおよびマーカー染色剤（フォルムアミド，フォルムアルデヒド，MOPSバッファー，キシレンシアノールおよびブロモフェノールブルーなど）です．
- ◆試料を65℃で10分間インキュベートしRNAを変性させ，氷上で急冷させます．
- ◆RNaseフリーの電気泳動用バッファーを泳動槽に流し入れます．バッファーがゲルのふちまで来るようにし，試料をロードするウェルにかからないようにします．
- ◆グリセロールを含まない試料を，ドライ（バッファーのない）ゲルにロードします．
- ◆試料をロードしたサンプルウェルの上面のところまで電気泳動用バッファーで注意深く満たします．
- ◆電気泳動を開始します（100V）．
- ◆試料がゲル内に移動したら（およそ10分後）電気泳動を停止させて，電気泳動用バッファーを泳動槽に加えます．このときはゲルが完全に覆われるまで加えます．
- ◆電圧を下げて，ゲルを通常通りに泳動させます．
- ◆RNA用のゲルでは，フォルムアルデヒドの濃度を２%まで落とします．このような低フォルムアルデヒドゲルでは，解析度の高いシャープなバンドが得られます．

4. 2. 2 パルスフィールドゲル電気泳動

パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）は標準的なアガロースゲル電気泳動に比べてかなり複雑です．この電気泳動の分離条件にはコツを要し，極めて大きなDNAフラグメントのブロッティングには必要不可欠です．いずれにしても，PFGEの操作を慎重に行い，核酸のブロットトランスファーが完全であれば，DIG検出システムによりブロット上の特異的なシークェンスが，十分な感度で検出されます．

ノート： PFGEのテクニックについての詳細な情報については，*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*（Sambrook, Fritsch, and Maniatis）など一般的な実験マニュアルを参照ください．

5. ターゲット核酸をメンブレンへブロットトランスファーする

アプリケーションに応じた最適なブロットトランスファーの方法を選択するために，以下の表を参考にしてください．
DIGシステムに関して，標準的なサザンやノーザンブロットにはキャピラリートランスファー法をお薦めします．

ノート：ブロットトランスファー前のゲルの処理方法のコツについては，付録 Cのトピック3に詳説されています．参照ください．

いろいろなブロットトランスファー法とその特色

トランスファー法	ブロッティング前のゲルの処理	塩の量	操作技術	この方法の特長
キャピラリートランスファー	**サザン：** 脱プリン（ターゲットが≧ 5 kbの場合），変性，中和 **ノーザン：** 20 × SSCに10分間浸漬しフォルムアルデヒドを除去	20 × SSCトランスファー用バッファー（ノーザンではRNaseフリー）	● バッファー中をターゲットが一方向に移動する受動的トランスファー ***ノート：***キャピラリートランスファー法の詳細については，第 2 章，87ページのセクション 3.1.2.2（DNA用）または，第 2 章,98ページのセクション 3.2.2.2（RNA用）を参照ください．	●最高の感度が得られる． ●信頼性と再現性が高い． ●不完全なトランスファーは,ハイブリダイゼーションの前にはっきりとわかる．
ドライブロット	20 × SSCに20〜30分間浸漬する．	トランスファー用バッファーは必要ない．	● トランスファー用バッファーを用いずゲル中に存在するバッファーを用いる一方向または二方向のキャピラリートランスファー． ● 両方向にトランスファーできる（サンドイッチブロット）	●高濃度アガロースゲルに適する（4〜6%ゲルを用いるゲルシフトアッセイや，最大10%ゲルを用いるオリゴヌクレオチドの分離など）． ● 1 枚のゲルから 2 枚のブロットを調製可能．
コンタクトブロット	必要なし ***ノート：***この方法は直接検出を行うアッセイにのみ用いられる（RNaseプロテクションアッセイなど）．通常のサザンやノーザンには使用できない．	トランスファー用バッファーは必要ない．	● 前もって浸漬する操作なしのドライブロット形式． ● トランスファー用バッファーを用いずゲル中に存在するバッファーを用いる． **注意：**トランスファーは電気泳動の直後に始めてください． 時間が経過するとDNAがゲル中で乾燥し，トランスファーがなされません．	●シークェンス用ゲルに適する． ●0.2 mmの厚さのゲルが理想的． ***ノート：***ゲルの厚さは0.2 mmを上回らないこと． ● トランスファー時間が短い（およそ20分間）． ●直接検出アッセイを行う全ての実験に使用可能（RNaseプロテクションアッセイなど）．
エレクトロブロッティング	トランスファー用バッファー中で平衡化させる．	製造メーカーの薦める方法に従う．	● 電流を利用しトランスファーの速度を速める． ● **注意：**ポリアクリルアミドゲルにのみ推奨．	● トランスファーが速い．
バキュームブロッティング	キャピラリートランスファー法と同じ．	DNAまたはRNA用 20 × SSC	● 吸引を利用しトランスファーの速度を速める． **注意：**吸引に支障があるとブロットが破損し，完全なトランスファーが行われない． ● 通常，アルカリトランスファー（0.4 M NaOHをトランスファー用バッファーに使用）と共に用いる（DNAのみ）． **注意：**アルカリ法はDIGシステムにおいて感度低下をもたらすという報告がある．アルカリトランスファー後にクロスリンクを行わないこと．	● トランスファーが速い（およそ 1 時間）． **注意：**キャピラリーブロッティングほど感度は高くない．

5. 1 ブロッティングメンブレンについて

ブロッティングに使用するタイプのメンブレンは，DIGシステムのアッセイの感度およびバックグラウンドに作用します．メンブレンの選択肢と特色を下の表に示します．

いろいろなタイプのブロッティングメンブレンとその特色

メンブレンのタイプ	アプリケーション	解　説
ロシュ・ダイアグノスティックス社製，ポジティブチャージのナイロンメンブレン	発色および化学発光検出のどちらにも適する．	●ニトロセルロースよりも耐久性がある． ●ニトロセルロースよりも感度が高い． ●チャージのないナイロンメンブレンに比べ，ターゲットとの結合能力が高い． ●ポジティブチャージはバックグラウンドを低く，SN比（signal-to-noise ratio）が最大になるように調整されている． ●DIGシステムで試験されている．
他社製，ポジティブチャージのナイロンメンブレン	発色および化学発光検出のどちらにも適する．	●メンブレン上のチャージが多様であるため，バックグラウンド，ロット間，ブランド間での違いが大きい． ***ノート：***製造メーカーの多くは荷電密度の最小値を測るためのアッセイをするものの,最大値を試験していない場合が多い．したがって，ある製造メーカーの１つのロットでは最少荷電密度をやや上回って良好な結果が得られても，次に荷電密度が100倍のロットを使用して非常に高いバックグラウンドが生じることがある．[1]
チャージのないナイロンメンブレン	発色および化学発光検出のどちらにも適する．	●ポジティブチャージのナイロンメンブレンに比べ，ターゲットとの結合能力が低い．
ニトロセルロースメンブレン	発色検出のアッセイに適する． ***ノート：***ナイロンメンブレンに比べ，感度が低い．	●化学発光アッセイではメンブレンの表面が疎水性である必要があるため,一般的にニトロセルロースメンブレンは化学発光検出アッセイには使用できない． ***ノート：***特殊な疎水性ニトロセルロース（Nitro-Block）がTropix社から発売され，これは化学発光のアッセイに使用できる．しかしながら，ナイロンメンブレンの性能に比べ，感度が 10〜100倍低くなる． ●DNAをUVクロスリンクすることはできない．

1 他社製のナイロンメンブレンにおける荷電（チャージ）のロット間差を補うには，DIG Easy Hybハイブリダイゼーション用バッファーを使用してください．
DIG Easy Hybは荷電密度の違いにより生じるバックグラウンドの問題を最小限に抑え，バックグラウンドの低い結果をもたらします．

6. ターゲット核酸とプローブとのハイブリダイゼーション

DIGラベルされたプローブと，ブロット上にあるターゲット核酸とをハイブリダイズさせるための最良の条件を選択するために，このセクションを参考にしてください．

解説：DIGラベルされたプローブと^{32}Pラベルされたプローブは動力学的によく似た動きを示します．したがって，これらは同様のハイブリダイゼーション条件下で使用することができます．

6. 1 ハイブリダイゼーション中でのDIGラベルされたプローブ濃度

DIGラベルされたプローブのタイプと薦められる使用濃度

プローブのタイプ	ハイブリダイゼーション中でのプローブの濃度
ランダムプライムド法でラベルされたDNA	25 ng/ml
PCR法でラベルされたDNA	1 ml当たり2 μlの標準的なPCRラベリング反応液
トランスクリプション法でラベルされたRNA	20 ～ 100 ng/ml
末端ラベルされたオリゴヌクレオチド	1 ～10 pmol/ml
テール付加されたオリゴヌクレオチド[1]	0.1 ～ 10 pmol/ml

1 テール付加されたオリゴヌクレオチドについては，0.1 mg/mlのポリ[A]と5 μg/mlのポリ[dA]とをプレハイブリダイゼーション用およびハイブリダイゼーション用バッファーに加えます．ポリ[A]やポリ[dA]はテール部分により生じ得る非特異的なシグナルを抑えます．

6. 2 最適なハイブリダイゼーション温度の決定

最適なハイブリダイゼーション温度を決定する際に，環境的な要素，塩基配列に関係する要素，そしてハイブリッドのタイプについて常に検討する必要があります．これらの要素がどのように作用するかについて，次に記します．

6. 2. 1 ストリンジェンシーに影響を与える三つの環境的な要素

どのようなハイブリダイゼーションにおいても，ストリンジェンシーは三つの要素（温度，塩濃度，フォルムアミドの濃度）の扱い方によって変化します．

要　素	作　用
温　度	● 高温では，ストリンジェンシーが高まる． ● 低温では，ストリンジェンシーが低下する．
塩濃度	● 塩濃度が高いと，ストリンジェンシーが低下する． ● 塩濃度が低いと，ストリンジェンシーが高まる．
フォルムアミド	● DNAの融点を低下させるため，プローブとターゲットとのハイブリッドが形成される温度を低くする作用がある． ***ノート：***1%フォルムアミドを加えると，融点は0.72℃低下する．

例：高温かつ**低**塩濃度の組み合わせは，ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを高めます．

6. 2. 2 種類の違う核酸ハイブリッドがハイブリダイゼーション温度に与える影響

種類の違う核酸ハイブリッドの強さの関係は，以下の通りです．

RNA：RNAハイブリッド > RNA：DNAハイブリッド > DNA：DNAハイブリッド

結論：ハイブリッドのタイプは，使用するハイブリダイゼーション温度に影響します．RNA：RNAおよびRNA：DNAハイブリッドは，DNA：DNAハイブリッドに比べて，より高いハイブリダイゼーション温度を必要とします．

例：40%のGCシークェンスをもつ哺乳類由来のターゲットに対して，それぞれのタイプのハイブリッドのDIG Easy Hyb（または50%フォルムアミド）中での最適なハイブリダイゼーション温度は，下の表の通りです．

ハイブリッドのタイプ	最適なハイブリダイゼーション温度 (T_{opt})
DNA：DNA	37 ～ 42℃
DNA：RNA	50℃
RNA：RNA	68℃

注意：これらのハイブリッド全てについて，T_{opt}はプローブのGC含有率とターゲットとのホモロジーにより変化します．
例えば，GC含有率が40～50%，ターゲットとのホモロジーが80～100%のDNA：DNAハイブリッドでは，T_{opt}が37℃から42℃の間を変動します．

6. 2. 3 シークェンスに関連する要素がハイブリダイゼーション温度に与える影響

前に述べた環境的な要素に加え，プローブとターゲットとのホモロジーやプローブのGC含有率も最適なハイブリダイゼーション温度に影響を与えます.
最適なハイブリダイゼーション温度(T_{opt})を決定するために，まずプローブとターゲットのハイブリッドの融点(T_m)を算出し，T_mより20℃～25℃低い温度をT_{opt}として算出します.

ノート：計算例については，付録 A, 158ページの「プローブをターゲット核酸にハイブリダイズさせる」を参照ください.

6. 3 ハイブリダイゼーション用バッファーの組成

ハイブリダイゼーション用溶液の多くは，DIGシステムとの共用が可能です.

例えば，以下の表にあるバッファーはいずれもDIGシステムに使用することができます.

DIGシステムとの共用に適しているハイブリダイゼーション用バッファー[1]

DIG Easy Hyb	高SDSバッファー	標準的なバッファー + フォルムアミド	標準的なバッファー
Cat. No. 1 603 558 （次ページ参照） 〈DIG Easy Hyb, Granules（Cat. No. 1796 895）〉	7% SDS 50%フォルムアミド（脱イオン） 5 × SSC 2%ブロッキング試薬[2] 0.1%（w/v）N-lauroylsarcosine 50 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0	50% フォルムアミド（脱イオン） 5 × SSC 0.1%（w/v）N-lauroylsarcosine 0.02%（w/v）SDS 2% ブロッキング試薬	5 × SSC 0.1%（w/v）N-lauroylsarcosine 0.02%（w/v）SDS 1% ブロッキング試薬

1 薦められる順序で左から右に順に列挙.
2 ブロッキング試薬は，乳粉末の精製フラクションで，再懸濁しマレイン酸バッファー［0.1 Mマレイン酸，0.15 M NaCl，NaOH（固体）を用いてpH 7.5（20℃）に調整］中で希釈する.

これまでの経験から，最適なハイブリダイゼーション用バッファーはDIG Easy Hyb（Cat. No. 1 603 558）であることが示されています．当社がDIG Easy Hybを薦める理由は，以下の通りです．

- 50%フォルムアミド（フォルムアミド1%ごとに0.72℃まで）と同じところ（36℃）まで融点を低下させます（ハイブリダイゼーション温度が低いということは，それだけ再現性ある結果が得られるということにつながります）．
- DIG Easy Hybはフォルムアミドを含まないため無害で使用上安全です．
  ノート：フォルムアミドの代用として，DIG Easy Hybには50%フォルムアミドと同じようにハイブリダイゼーション温度を低下させるため，十分な量の尿素が含まれています．
- 滅菌であることが保証され，かつDNaseやRNaseフリーであるため，テンプレートやプローブが分解される心配はありません．
- ナイロンメンブレンを用いた全てのタイプのブロットの試験により，DIGシステムを使用して最良の結果が得られることが確認されています．
- そのまま使用する（ready-to-use）ハイブリダイゼーション用バッファーです．何も加える必要がありません．
- 室温で保存することができるため，扱いやすいです．
- 他社製のメンブレンにおけるロット間差を補うために役立ちます（詳細については，この章の122ページ，セクション5. 1を参照ください）．

6. 3. 1 添加剤の作用

ハイブリダイゼーション用バッファーに添加剤を加えると，ハイブリダイゼーションの感度が高まるということが^{32}Pプローブにおいて報告されています．例えば，10%の硫酸デキストランや6～10%のPEG8000の添加により，ハイブリダイゼーションの感度を2倍から3倍高めることが可能です．
しかし，当社で検討したところ，硫酸デキストランやPEGをDIG Easy Hybバッファーに添加しても，DIGラベルされたプローブの感度は高くなりません．また，硫酸デキストランやPEG8000にはかなりのロット間差があるため，これらの製品の使用は薦められません．良くないロットは，高いバックグラウンドを生じることになります．
通常の原則として，ノンラジオアクティブなハイブリダイゼーション実験において最良の結果を得るためには，DIG Easy Hybにはどのような化合物も加えず，そのまま使用してください．

6. 4 ハイブリダイゼーションの所要時間

プローブとターゲットとが十分にハイブリダイズするための所要時間は，プローブのタイプや感度に依存します．下の表は，一般的にDIG Easy Hybをプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション用バッファーとして使用した場合に要するハイブリダイゼーション時間のガイドラインです．

代表的なハイブリダイゼーション時間[1]

アプリケーション	薦められるハイブリダイゼーション時間[2]	実験例などが記されているページ
DNA：DNAハイブリダイゼーション		
シングルコピー遺伝子の検出	ON（12〜16時間）	173
DNAフィンガープリンティング（多遺伝子座プローブ）	2 〜 4 時間	-
DNAフィンガープリンティング（単一遺伝子座プローブ）	ON（12〜16時間）[3]	-
コロニー/プラークハイブリダイゼーション	少なくとも 4 〜 6 時間（ONまで）	135
RNA：RNAハイブリダイゼーション	少なくとも 4 〜 6 時間（ONまで）	113
オリゴ：DNAハイブリダイゼーション	少なくとも 1 〜 6 時間（ONまで）	-

1 全てのアプリケーションにおいて，プレハイブリダイゼーション（プローブを含まない）時間は30分間．
2 ON = オーバーナイト
3 DIG Easy Hybを用いて 4 〜 6 時間で完了する．

7. ブロットをストリンジェント洗浄する

ハイブリダイゼーションの後に不要なハイブリッドを取り除くため，2段階のストリンジェント洗浄を行います.

- **1 回目の洗浄**：低ストリンジェンシー（塩濃度が高く，低温）の条件で，非特異的に結合しているプローブを取り除きます.

DIGシステムにおいて薦められる，低ストリンジェンシー洗浄の条件は，以下の通りです.

ハイブリッドのタイプ	低ストリンジェンシー洗浄の条件
全て	● 0.1% SDS，2 × SSC中で，室温にて 5 分間 × 2 回

- **2 回目の洗浄**： 高ストリンジェンシー（塩濃度が低く，高温）の条件で，ホモロジーの低い不要のハイブリッドを取り除きます.

  注意：高ストリンジェンシー洗浄用バッファーはあらかじめ適切な温度まで温めてから，メンブレンの処理に使用してください. 温度が低いまま処理すると，ホモロジーの低いハイブリッドを短時間で除去できないことがあります.

DIGシステムで薦められる高ストリンジェンシー洗浄の条件は，ブロット上のハイブリッドのタイプに依存します. 以下の表を参照ください.

ハイブリッドのタイプ	高ストリンジェンシー洗浄の条件[1]
DNA：DNA	● 0.1% SDS，0.5 × SSC中で，65℃にて15分間 × 2 回（哺乳類由来DNA） ● 0.1% SDS，0.1 × SSC中で，68℃にて15分間 × 2 回（*E. coli* 由来DNA）
RNA：DNA または RNA：RNA	● 0.1% SDS，0.1 × SSC中で，68℃にて15分間 × 2 回
オリゴ：DNA	● 0.1% SDS（最低でも）を含む1 × SSC中で，ハイブリダイゼーションに使用した温度にて *ノート：*最適温度は多様
1 高ストリンジェンシー洗浄用バッファーは，常にメンブレンに加える前に適温まで温めてください.	

8. プローブとターゲット核酸とのハイブリッドを検出する

プローブとターゲットとのハイブリッドは，酵素免疫アッセイを用いて検出されます．この免疫化学的な検出のステップは，ラジオアクティブな検出方法に比べて高い感度を示します．

酵素免疫アッセイでは，抗体がメンブレンフィルターと非特異的に反応(結合)することを防ぐため，はじめにメンブレンをブロックします．次に，アルカリホスファターゼ標識されたジゴキシゲニン特異抗体により，ラベルされたハイブリッド上のDIG分子を認識させます．

最後に，アルカリホスファターゼ基質を加え，ハイブリッドを可視化させます．

基質についてはさまざまなものが手に入りますが，このアッセイでは発色と化学発光の2つの基本的なタイプのみを用いて可視化を行います．一般的に，化学発光のアッセイ(< 1時間)は発色のアッセイ(オーバーナイト)に比べて短時間で可視化が可能です．しかし，2つのタイプのアッセイはそれぞれ特定の実験系に適した利点を備えています．

それぞれのアプリケーションに最適な基質を選択するため，いくつかのアルカリホスファターゼ基質とその特色について，以下の一覧表にまとめました．以下の基質は全て，ロシュ・ダイアグノスティックス社より発売されています．

アルカリホスファターゼ基質とその特色

基　質	展開反応時間	注意する点	特　　長	アプリケーションのため参照するページ
CDP-*Star* (化学発光)	多様． ***ノート：***最初のX - 線フィルム[1]への露光時間は5～15分とすること．最初の結果のフィルムを検討し，これをもとに次の露光時間を設定する．	●プレインキュベーションの必要なし灰色の陰影(基質の滴下による)やメンブレンの乾燥（不均一で強いバックグラウンドの原因）を防ぐため，基質のアプライは迅速に行うこと ●ブロットのカバーにプラスチック製ラップを使用しないこと．ハイブリダイゼーション用バッグ，アセテート製シートプロテクター，または透明(transparency)フィルム2枚を使用すること． ●CSPDに比べ，露光時間は短くなる． ●ニトロセルロースメンブレンには使用できない． ●基質を加えてからまる2日までは，露光を繰り返すことができる．	●最も感度の高い方法である． ●時間を節約できる． ●露光時間を長めに設定すれば，以下のように試薬量を節約できる． ● ハイブリダイゼーション中のプローブ量を減らす． ● 抗体の量を減らす（1：20,000希釈）． ● CDP-*Star* を希釈して使用する（1：100, 1：200または1：500） ●メンブレンからのプローブの剥離やリプロービングが簡単である． ●それぞれの実験において何度も露光を行うことができる． ●基質を再使用することができる（ろ過してアジ化ナトリウム中にて保存）．	108 （第2章）
CSPD (化学発光)	多様． ***ノート：***最初のX - 線フィルム[1]への露光時間は15～30分とすること．最初の結果のフィルムを検討し,これをもとに次の露光時間を設定する．	●プレインキュベーションにより活性化させる(37℃にて10分間)． ●メンブレンの乾燥(不均一で強いバックグラウンドの原因)を防ぐため,基質のアプライは迅速に行うこと ●ブロットのカバーにプラスチック製ラップを使用しないこと．ハイブリダイゼーション用バッグ,アセテート製シートプロテクター，または透明フィルム2枚を使用すること． ●ニトロセルロースメンブレンには使用できない． ●基質を加えてから数日後でも，露光を繰り返すことができる．	●時間を節約できる． ●メンブレンからのプローブの剥離やリプロービングが簡単である． ●それぞれの実験において何度も露光を行うことができる． ●基質を再使用することができる（ろ過してアジ化ナトリウム中にて保存）．	108 （第2章）

基　質	展開反応時間	注意する点	特　　長	アプリケーションのため参照するページ
NBT/BCIP（発色）[2]	5 分間～オーバーナイト	●希釈溶液は常に新しく調製し，ストック溶液は暗所に保存する． ●暗所で発色展開させる． ●異なるメンブレンでは，発色も異なる． ● 1 実験当たり，1 回しか結果が得られない． ●プローブの剥離には，有害なジメチルフォルムアミドの使用が必要となる．	●ニトロセルロースやナイロン製のメンブレンに使用できる． ●*In situ* ハイブリダイゼーションへの使用が薦められる． ●バックグラウンドはメンブレンの片面のみに生じる． ●ブロットを再び水和させることにより，シグナルを再生することができる．	119（第 2 章）
Fast Red Fast Green Fast Blue（発色）[2]	2 ～ 3 時間	●プラスミドのマッピング，コロニー/プラークハイブリダイゼーション，細菌や酵母菌遺伝子のサザンブロット，mRNA発現の高いノーザンブロットの検出に適する．また，ブロットにターゲットが高濃度で含まれる場合，複合DNA中の遺伝子の検出も可能である． ●他のアルカリホスファターゼ基質に比べ，感度が低い．	●それぞれの色素が異なる発色沈殿を生じるため,複数のターゲットの検出が可能である． ●単にエタノールで洗浄することにより，メンブレンからプローブを剥離することが可能である．	124（第 2 章）

1 化学発光基質の発光は．X-線フィルムを用いずイメージャーで検出することも可能です（本書の第 3 章を参照）
2 その他のアルカリホスファターゼ（およびペルオキシダーゼ）の発色基質については，ロシュ・ダイアグノスティックス社の総合カタログを参照ください．

9. メンブレンからのプローブの剥離とリプロービング

ハイブリダイゼーション後，メンブレンからDIGラベルされたプローブを剥離し，別のプローブを再度ハイブリダイズさせることが可能です．アルカリに不安定なDIG(弊社の大部分のラベリングキットに含まれる)を用いてラベルしたプローブをハイブリダイズさせ，ターゲットのシークェンスがほとんど損傷を受けることなくメンブレンからプローブを剥がすことが可能です．このマイルドな剥離の方法(下の表に解説されています)により，何度も感度の高いリプロービング実験を行うことが可能です(図 8).

重要なTip： **剥離する前にメンブレンを乾燥させないでください.** いったん乾燥させてしまうと，そのメンブレンからの剥離やリプロービングができなくなります．

ノート： これら方法の各ステップの詳細は，第 2 章の122ページ，セクション 5 を参照ください．

ブロッティングメンブレンからアルカリに不安定なプローブを剥離する方法の概要

ブロッティングのタイプ	剥離するもの	使用する方法[1]
サザン	化学発光産物とプローブ	● H_2O中で1分間洗浄する． ● 0.2 M NaOH / 0.1% SDSを用いて37℃にて15分間×2 回洗浄する[2,3]. ● 2×SSCで 5 分間洗浄し，2×SSC中で保存する．
	発色産物(NBT/ BCIP反応による)とプローブ	● ジメチルフォルムアミド中で50-60℃にて 1 時間以上，発色がなくなるまでインキュベートする(溶液を数回変える必要がある)． ● H_2O中で 1 分間洗浄する． ● 0.2 M NaOH / 0.1% SDSを用いて37℃にて20分間×2 回洗浄する[2,3]. ● 2×SSCで 5 分間洗浄し，2×SSC中で保存する．
ノーザン	化学発光または発色産物とプローブ	● 50%フォルムアミド(脱イオン)/ 5% SDS / 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)中で，80℃にて60分間×2 回インキュベートする[4,5]. インキュベーションにはシールドバッグを使用する． ● 2×SSCで室温にて 5 分間洗浄し，2×SSC中で保存する[6].

1 剥離する前にメンブレンを乾燥させないでください．いったん乾燥させてしまうと,そのメンブレンからの剥離やリプロービングができなくなります．
2 このテクニックを使用することにより，1つのサザンブロットを最大20回までリプロービングが可能であることが示唆されています．
(0.4 M NaOHを65℃にてというような研究報告がありますが,)本書の記載よりも高濃度のNaOHを使用しないでください．このアルカリによる剥離法は，ノーザンブロットには絶対に使用しないでください．
3 NaOH溶液をガラス製容器で保存しないでください．保存にはプラスチック製容器のみを使用してください．
4 RNAプローブの剥離用溶液として，別に90%フォルムアミド / 10 mMリン酸ナトリウム(pH 7.5)があります．強アルカリはターゲットのRNAを壊すため，NaOHは使用しないでください．
5 全ての溶液を使用時に新しく調製してください．また，RNaseフリーの試薬のみを使用してください．
6 この剥離法により，剥離とリプロービング反応を何度も行うことが可能です．1つのノーザンブロットから最大14回までリプロービングが可能であることが分かっています(図 8 参照)．

ノーザンブロットのプローブ剥離とリプロービング

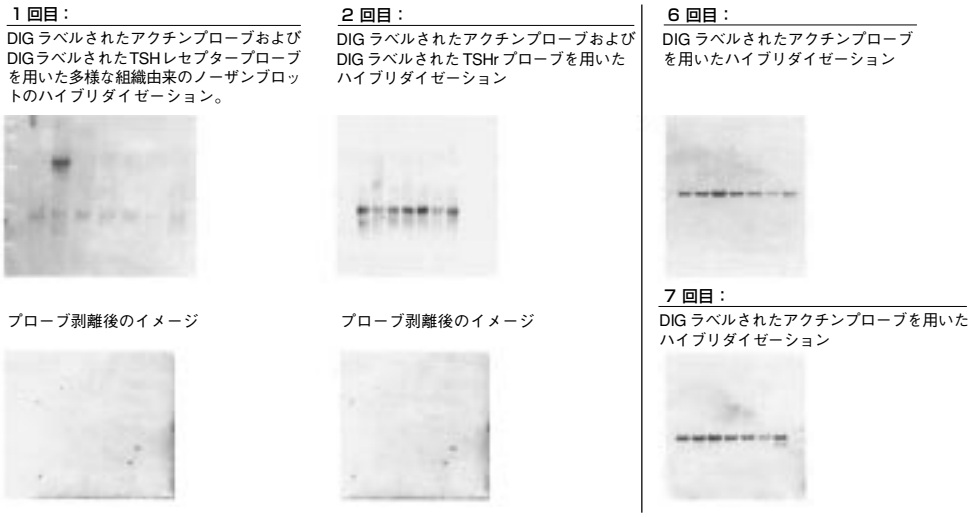


図 8. 複数回のリプロービング実験を目的としたノーザンブロットからのアルカリに不安定なDIGでラベルされたプローブの剥離. さまざまな組織由来のRNAを解析するため，2 種類のDIGラベルされたプローブが使用された．1つはアクチンRNAを認識し，もう 1つはTSHレセプター（TSHr）を認識するものである．両方のプローブまたはアクチンプローブのみを使用して同一のメンブレンに反復してハイブリダイゼーションを行った．それぞれのプローブの検出には，標準的なテクニック（第 2 章を参照）を使用した化学発光が用いられた．それぞれの実験間のDIGラベルされたプローブの剥離には，50%フォルムアミド/5%SDS/50 mM Tris（セクション 9 の表を参照）が用いられた．1 回目，2 回目，6 回目，7 回目のハイブリダイゼーションの結果を上に示す．

結果：それぞれのプローブはバックグラウンドのない強いハイブリダイゼーションのシグナルを発しました．剥離の操作中にターゲットのRNAが失われることは，実質上ありませんでした．当社の研究室では，この剥離とリプロービングのテクニックを使用して，1 枚のメンブレンを最大14回まで解析することに成功しています．

10. DIGラベリングおよび検出実験のための設備

以下の表は, DIGラベリングおよび検出実験のために必要とされる設備, 器具など常備品, およびロシュ社の試薬を一覧にしたものです.

DIG実験で必要とされる主な実験設備

設　備	必要な数
マグネティック・スターラープレート	1
ヴォルテックス（Vortexer）	1
マイクロ遠心分離機（Microcentrifuge）	1
UVクロスリンカー（Stratalinkerなど）	1
水平式のゲル電気泳動装置	1 ～ 2
パワーサプライ	1 ～ 2
マイクロウェーブ	1
バランス	1
UVトランスイルミネーター	1
沸騰用ウォーターバス	1
温度調節（37℃～68℃）ができるシェーカー付きウォーターバス	1 ～ 2
PCRサーマルサイクラー[1]	1
ハイブリダイゼーション用バッグを閉じるためのヒートシーラー	1
フィルム現像装置[2,3]	1
X-線フィルム用カセット[3]	2 ～ 3
水平式平面（プラットフォーム）シェーカー	1 ～ 2
冷凍冷蔵庫	1

1 PCRラベリングのみに必要.
2 DIGの実験操作エリアの近くに設置すること.
3 イメージャーが設置されている場合, X-線フィルムや器具は不要.

一般的な実験器具

器　具
スパーテル
三角（アーレンマイヤー）フラスコ（200 ml, 500 ml）
滅菌済みメスシリンダー（50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml）
ガラスびん（1リットル, 500 ml）
マグネティック・スターラーバー（滅菌済み，RNaseフリー）
温度計
ピペッター（1 ml, 200/100 µl, 10 µl）
ピペッター用滅菌済みチップ
滅菌済みピペット（10 ml）
ピペッティング用バルブ
滅菌済みマイクロ遠心チューブ（1.5 ml）
マイクロ遠心チューブ立て
パラフィルム
はさみ
先の平らなピンセット
解剖用メス（スカルペル）（オプション）
Whatman 3 MM ろ紙
手袋, いろいろなサイズ（パウダーフリー）
油性マーカー
50 ml 滅菌ディスポーザブルの目盛り付き円錐チューブ
15 ml 滅菌ディスポーザブルの目盛り付き円錐チューブ
ディスポーザブルの実験用タオル
発砲スチロール製で浮力のあるマイクロ遠心チューブ立て
ふた付きプラスチック製トレー（プレハイブリダイゼーション，ハイブリダイゼーション，検出の際のインキュベーション用）
150 mm ペトリ皿（ラベリング効率を直接検出する際のインキュベーション用）
ディスポーザブルの実験用ティッシュ
氷を入れる容器と氷
実験台用紙
アルミホイル
鉛の輪などの重り（ハイブリダイゼーション用メンブレンをインキュベーション中に水平に保つため）
アセテートセルロースフィルター, 0.45 µm（オプション, ラベルされたプローブの精製のため）

器　具
滅菌済みシリンジ(5 ml)(オプション, フィルター滅菌用)
タイマー
Thin-walled PCR用チューブ(200 μl)
フィルター滅菌済み再蒸留水
フィルター滅菌, DMDCまたはDEPC処理済み再蒸留水
RNase-ZAPまたは同様の製品
エチルアルコール

ロシュ・ダイアグノスティックス社から発売されている試薬およびキット

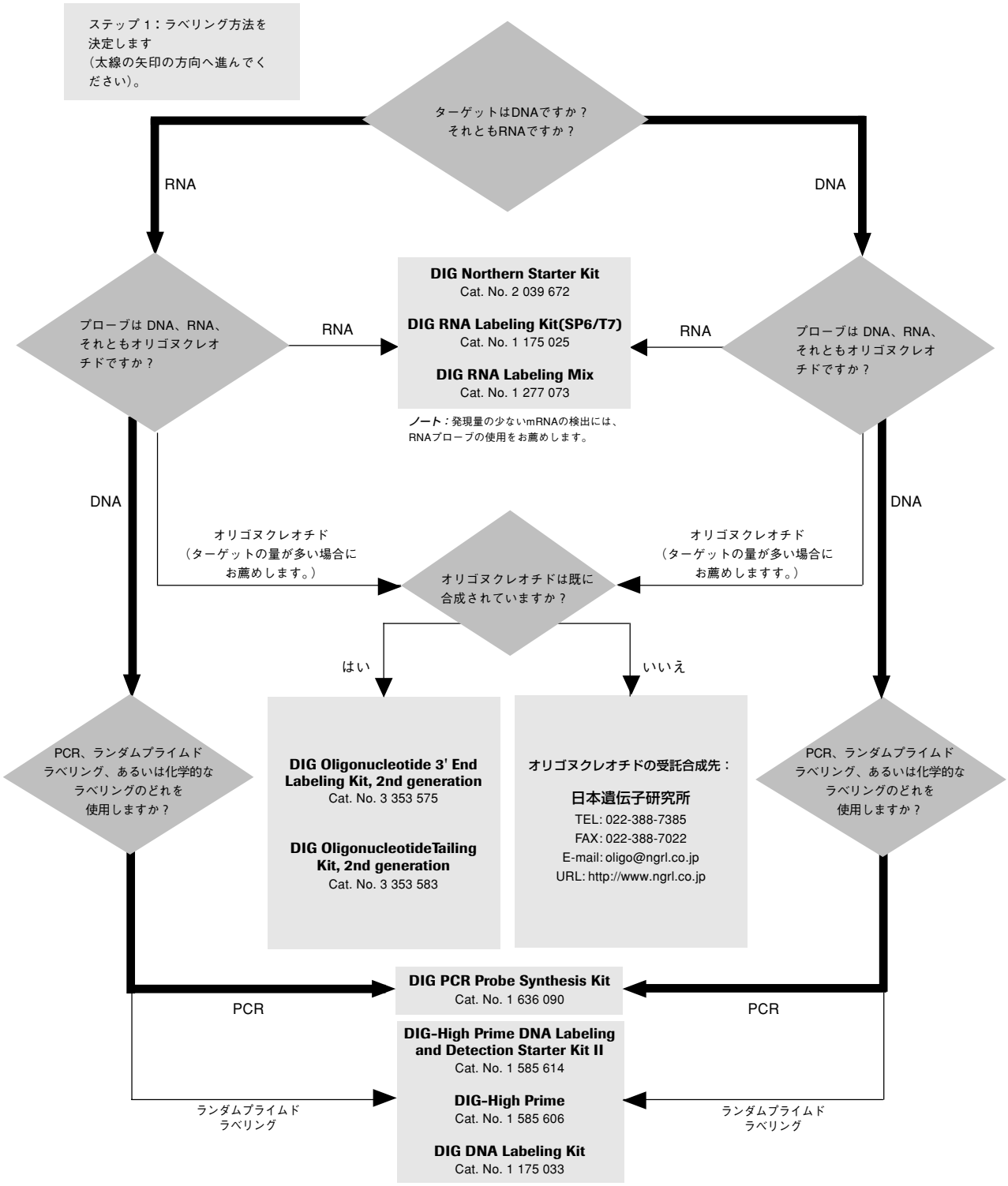
試薬およびキットの名称	カタログ番号
High Pure Nucleic Acid Purification Kits	ノート1 を参照
DNAまたはRNA Labeling Kit(s)	この章の41ページ, セクション2 を参照
Agarose, MP	1 444 964
SDS, 粉末	1 028 693
DNAまたはRNA Molecular Weight Marker, unlabeled	ノート2 を参照
DNAまたはRNA Molecular Weight Marker, DIG-Labeled	ノート2 を参照
Hybridization Bags	1 666 649
DIG Easy Hyb buffer, ready-to-use, RNase- and DNase-free	1 603 558
20 × SSC	1 666 681
Anti-DIG-alkaline phosphatase (酵素標識抗体)	1 093 274
DIG Wash and Block Buffer Set	1 585 762
Nylon Membrane, Positively Charged	1 417 240
Chemiluminescent substrate – 選択が可能	
CDP-*Star*, ready-to-use	2 041 677
CSPD, ready-to-use	1 755 633
検出記録用設備	
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	1 666 657

1 High Pure核酸精製用キットは, 精製度の高いテンプレートを必要とするDIGラベリングに対して, 最も簡便な方法をもたらす製品ラインです. 現在発売されているHigh Pureの全製品については, ウェブサイトを参照ください (http：//www.roche-applied-science.com).

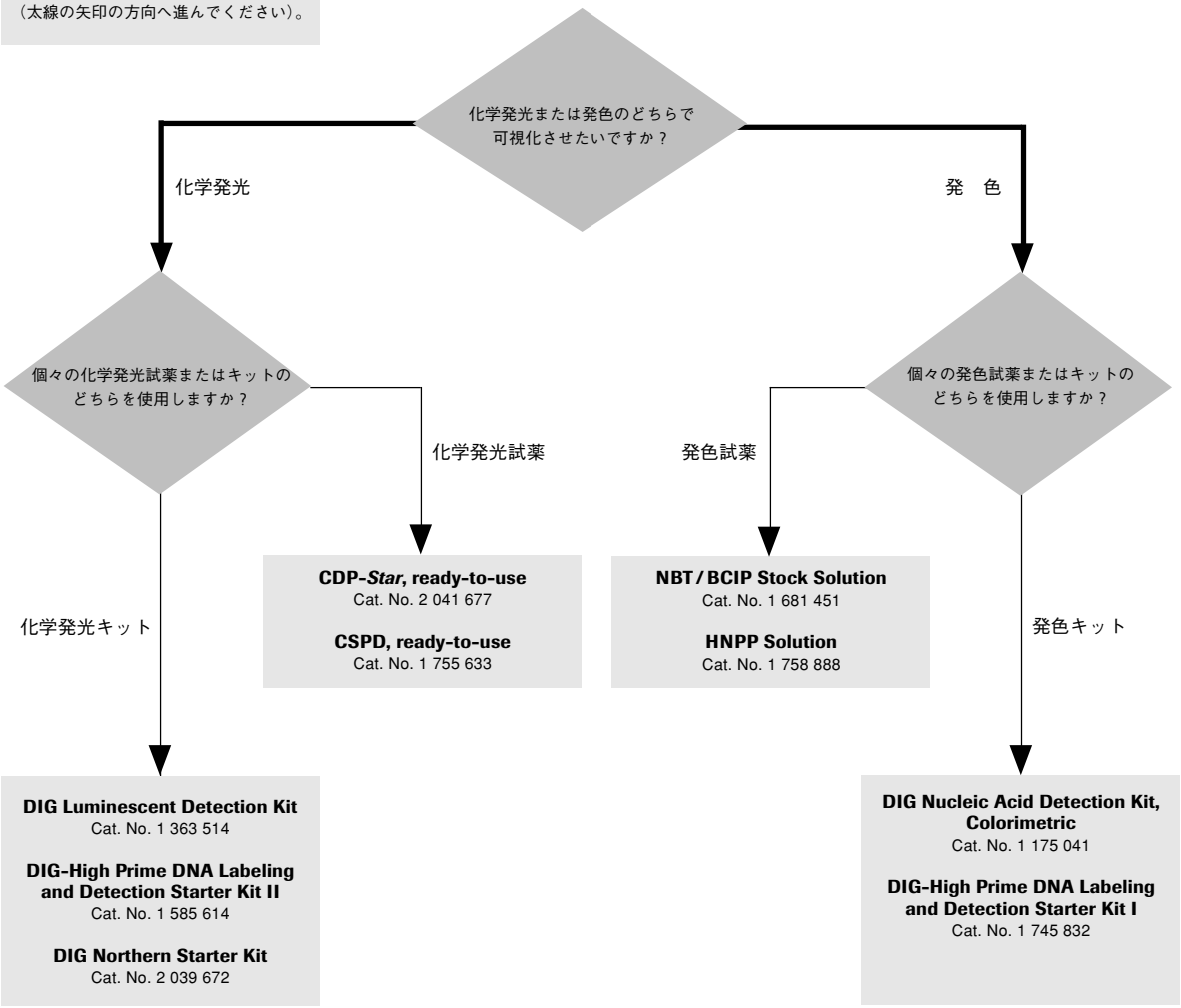
2 現在発売されている分子量マーカーについては, ウェブサイトを参照ください.
(http：//www.roche-applied-science.com)

11. DIG製品セレクションガイド：ご自由にお選びください.

ノート： これから行おうとするアプリケーションに最適なDIGシステムの組み合わせをイメージするために, 以下のページのセレクションガイドをご利用ください.



ステップ 2：検出方法を決定します
（太線の矢印の方向へ進んでください）。



ステップ3：最良の結果を得るために
Roche 社の他の製品を追加で使用します。

DIG を用いた実験操作を
成功させるために
薦められる製品は他にありますか？

以下にリストする
製品をご利用ください。

DIG Wash and Block Buffer Set
Cat. No. 1 585 762

DIG Easy Hyb
Cat. No. 1 603 558（溶液）
Cat. No. 1 796 895（顆粒）

Nylon Membranes（ポジティブチャージ）
Cat. No. 1 209 299（10 × 15 cm）
Cat. No. 1 209 272（20 × 30 cm）
Cat. No. 1 417 240（0.3 × 3 m）

Nylon Membranes for Colony/Plaque Hybridization
Cat. No. 1 699 075（直径 82 mm）
Cat. No. 1 699 083（直径 132 mm）

Hybridization Bags
Cat. No. 1 666 649（25 × 24 cm）

DNA Molecular Weight Markers, DIG-labeled
Cat. No. 1 218 590（DNA MWM II, DIG-labeled）
Cat. No. 1 218 603（DNA MWM III, DIG-labeled）
Cat. No. 1 669 931（DNA MWM V, DIG-labeled）
Cat. No. 1 218 611（DNA MWM VI, DIG-labeled）
Cat. No. 1 669 940（DNA MWM VII, DIG-labeled）
Cat. No. 1 449 451（DNA MWM VIII, DIG-labeled）

RNA Molecular Weight Markers, DIG-labeled
Cat. No. 1 526 529（RNA MWM I, DIG-labeled）
Cat. No. 1 526 537（RNA MWM II, DIG-labeled）
Cat. No. 1 373 099（RNA MWM III, DIG-labeled）

Lumi-Film
Cat. No. 1 666 657（20.3 × 25.4 cm）
Cat. No. 1 666 711（35 × 43 cm）

第２章：

ノンラジオアクティブなラベリングと検出の方法

1. はじめに …… 40

2. ハイブリダイゼーション用プローブのDIGラベリングに関するテクニック… 41
2.1 ランダムプライムド法によるDNAプローブのラベリング（高収量の方法） …… 43
2.2 PCR法によるDNAプローブのラベリング …… 51
2.3 トランスクリプションによるRNAプローブのラベリング …… 62
2.4 オリゴヌクレオチドのDIGラベリング …… 73
2.5 直接検出法によりプローブの収量を概算する …… 75

3. DIGラベルされたプローブをブロットへハイブリダイズさせるテクニック 84
3.1 DNAプローブのサザンブロットへのハイブリダイゼーション …… 84
3.2 RNAプローブのノーザンブロットへのハイブリダイゼーション …… 94
3.3 ブロットから最良の結果を得るために …… 103

4. ブロット上にハイブリダイズしたプローブを検出するテクニック …… 106
4.1 化学発光法によるブロット上にハイブリダイズしたプローブの検出 …… 106
4.2 発色法によるブロット上にハイブリダイズしたプローブの検出 …… 115

5. メンブレン上のプローブの剥離とリプロービングのテクニック …… 122
5.1 プローブを剥離させる反応に必要な材料 …… 122
5.2 操作方法 …… 123

6. DIGラベルされたプローブの大容量スクリーニング・アプリケーション … 125
6.1 DIGラベルされたプローブをコロニー/プラークハイブリダイゼーションに使用する 126

1. はじめに

本章では，DIGラベリングおよび検出において最も一般的に使用されている方法を実践するために必要な情報すべてがまとめられています．この情報は，DIGシステムを使用している当社研究室やお客様の研究室での長年にわたる数多くの実験操作の中で集積されたものです．これはまさしく「インサイダーのためのマニュアル」としてDIGシステムの多くの重要な部分を引き出しています．

ラベリングおよび検出の基本的なプロトコールに加え，本章では以下の内容を紹介しています．

- それぞれのプロトコールに必要なロシュ・ダイアグノスティックス社の製品およびその他の資材全て
- DIGの最良の結果を得るためのヒント，トラブルシューティングガイドや追加情報
- DIGシステムを用いて得られた代表的な実験結果
- DIGシステムのための大容量スクリーニング・アプリケーション

ノート: 基本的な方法に親しむため，本章を読んでください．基礎的な方法のいずれかについて，そのバリエーションの情報が必要であれば，本章に紹介されているDIG製品の取扱説明書の内容が参考になります．

DIGシステムを使用する際の追加情報については，ロシュ・ダイアグノスティックス社のウェブサイトを参照ください（http ://www.roche-applied-science.com/DIG）．

Tip : 本章の操作方法の活用についての概要は，5 ページの「DIGアプリケーションマニュアルの概要」を参照ください．

本章で解説される方法は次の通りです．

トピックの情報	セクション	ページ
ハイブリダイゼーション用プローブのDIGラベリングに関するテクニック	**2**	**41**
ランダムプライムド法によるDNAプローブのラベリング（高収量の方法）	2.1	43
PCR法によるDNAプローブのラベリング	2.2	51
トランスクリプションによるRNAプローブのラベリング	2.3	62
オリゴヌクレオチドのDIGラベリング	2.4	73
直接検出法によりプローブの収量を概算する	2.6	75
DIGラベルされたプローブをブロットへハイブリダイズさせるテクニック	**3**	**84**
DNAプローブのサザンブロットへのハイブリダイゼーション	3.1	84
RNAプローブのノーザンブロットへのハイブリダイゼーション	3.2	94
ブロットから最良の結果を得るために	3.3	103
ブロット上にハイブリダイズしたプローブを検出するテクニック	**4**	**106**
化学発光法によるブロット上にハイブリダイズしたプローブの検出	4.1	106
発色法によるブロット上にハイブリダイズしたプローブの検出	4.2	115
メンブレン上のプローブの剥離とリプロービングのテクニック	**5**	**122**
DIGラベルされたプローブの大容量スクリーニング・アプリケーション	**6**	**125**
DIGラベルされたプローブをコロニー/プラークハイブリダイゼーションに使用	6.1	126

2. ハイブリダイゼーション用プローブのDIGラベリングに関するテクニック

DIGシステムは，ハイブリダイゼーション用プローブをジゴキシゲニン(DIG)でラベルする方法を数多く提供します．
それらのうち5通りの方法をこのセクションで解説します．それぞれの目的に最適なラベリング方法を決定するための手がかりに，下の表を参照ください．

DIGラベリングのテクニックとその利点

ラベリング方法	プローブの種類	利　点
ランダムプライムドラベリング(高収量)法	DNA	● ランダムプライムドラベリング法では，20〜25ヌクレオチド伸長ごとにDIG 1分子を挿入します．この割合で，最少 0.1 pgのターゲットDNAの検出が可能です． ● 従来のランダムプライムドラベリング用混合液(もともとのDIG DNA Labeling Kit中の)に比べ，DIG-High Primeは短時間で非常に高い収量で新たなDNAを合成します． ● ランダムプライムドラベリング反応を10倍までスケールアップまたはスケールダウンさせることができるため,極めて少量(10 ng)から極めて多量(10 μgまで)のテンプレートからラベルされたプローブを合成することが可能です．
PCRラベリング	DNA	● 必要とされるテンプレートDNAが少量です(プラスミドDNAで10 pgまで，ジェノミックDNAで 1 〜50 ngまで)． ● PCRラベリングでは，他のラベリング法(特にランダムプライムド法)に比べ，テンプレートの精製が厳密である必要はありません． ● 他の方法に比べ，ラベリング反応の最適化の必要が少なくすみます(PCR DIG Probe Synthesis Kitに含まれるExpand High Fidelity酵素ブレンドを使用する場合)． ● ラベルされたプローブの収量が非常に高いです． ● ラベリングの効率は，ゲル電気泳動により速やかに評価することができます．
トランスクリプションによるラベリング	RNA	● DIGラベルされたRNAプローブは，RNAのターゲットに対しDNAプローブに比べてより良好な検出感度を示します(72ページの図13を参照)． さらに，このRNAプローブはノーザンブロットで高いシグナル-ノイズ比(S/N比)を示します． ● DIGラベルされたRNAプローブは，少量(=1 μgあるいは場合によって0.1 μg)のヒトのトータルRNAや植物RNAからの発現量の少ないmRNAの検出を可能にします． ● 1反応でラベルされたプローブを多量に得ることが可能です(例：1 μgのDNAテンプレートから10 μgのRNA)． ● ラベリング反応はスケールアップが容易で，ミリグラムレベルの産物を得ることが可能です． ● RNAプローブは1本鎖で，相対する鎖と再アニーリングすることがありません． ● DIGラベルされたRNAプローブは，*in situ* ハイブリダイゼーションに使用する際，弱いアルカリ処理で簡単に断片化させることが可能です．

ラベリング方法	プローブの種類	利　点
DIGオリゴ ラベリング	**オリゴ ヌクレオチド**	● 低分子のプローブはより短時間にターゲットとハイブリダイズします. したがってハイブリダイゼーション時間が短縮されます. ● オリゴヌクレオチドプローブは1本鎖であるため, ハイブリダイゼーション反応中にプローブがセルフ - ハイブリダイズ(再結合)することはありません. ● オリゴヌクレオチドのシークェンスを用途に応じて自分で合成することにより, ターゲット認識の最適化が可能です. ● オリゴヌクレオチドは低分子で細胞内に容易に拡散するため, *in situ* ハイブリダイゼーションのアプリケーションに理想的です.

プローブに対する最適なラベリング方法が決まったら, 下の表を参考に詳細なラベリング操作方法を見つけましょう.

トピックの情報		セクション	ページ
ランダムプライムド法によるDNAプローブのラベリング (高収量の方法) **主要な製品**：DIG-High PrimeまたはDIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II	⇒	2.1	43
PCR法によるDNAプローブのラベリング **主要な製品**：PCR DIG Probe Synthesis Kit	⇒	2.2	51
トランスクリプションによるRNAプローブのラベリング **主要な製品**：DIG Northern Starter Kit	⇒	2.3	62
オリゴヌクレオチドのDIGラベリング **主要な製品**：Oligonucleotide 3' End LabelingおよびTailing Kits	⇒	2.4	73
直接検出法によりプローブの収量を概算する	⇒	2.5	75

2.1 ランダムプライムド法によるDNAプローブのラベリング(高収量の方法)

ランダムプライムドラベリング法は均一にラベルされたDNAプローブを生成する方法として最も広く用いられています. この方法で生成されるプローブの感度は高く, (ヒトや植物のジェノミックDNAのように)複雑なターゲットからシングルコピー遺伝子を検出することが可能です.
ランダムプライムドラベリングでは, まずテンプレートのDNAを直鎖化して変性します. 次にランダム ヘキサマー(6 量体)のプライマー混合物がテンプレート上で結合した複数の部位に, Klenowポリメラーゼが DIG-dUTPを取り込ませていきます.
また, DIG-High Primeを用いたランダムプライムドラベリングにより, さらにプローブの収量を高めることが可能になりました. DIG-High Primeは従来の(もともとの)ランダムプライムドラベリング混合液を簡便かつ最適なものへとバージョンアアップした試薬です. 従来の方法に比べ, DIG-High Primeでは短時間かつ少量のテンプレートから, 高い収量で新しいDNAが合成されます.

例: 一般的に, DIG-High Primeは従来のランダムプライムドラベリング混合液ではオーバーナイトのインキュベーションで合成されるDNA量を, 1 時間以内で生成します.

	新しく合成されるDNAの量(ng)			
	DIG-High Primeを用いた場合		従来のラベリング混合液を用いた場合	
精製後のテンプレートの量(ng)	1 時間	20時間	1 時間	20時間
300	450	2000	120	500
1000	850	2300	260	780
3000	1350	2650	530	890

このセクションでは, DIG-High Primeを使用してDIGラベルされたDNAプローブを調製する方法について解説します. このセクションの内容は以下の通りです.

トピックの情報		ページ
ランダムプライムドラベリングに必要な材料	⇒	44
操作方法:		
● テンプレートの精製	⇒	45
● プローブのランダムプライムドラベリング	⇒	47
● プローブの収量の決定	⇒	47
● 次に行うこと	⇒	48
ランダムプライムドラベリングから最良の結果を得るために:		
● ランダムプライムドラベリングにおける大切なヒント	⇒	49
● ランダムプライムドラベリング法のトラブルシューティング	⇒	50
● ラベルされたプローブを"きれい"にすることで, バックグラウンドを抑える	⇒	50

2. 1. 1 ランダムプライムドラベリングに必要な材料

ランダムプライムドラベリングのための主要な製品

製品名	カタログ番号	製品の説明
DIG-High Prime	1 585 606	● ランダムプライムドラベリング用にあらかじめ混合された5×濃度の溶液.

その他のキットや試薬

できる限り簡便に操作を行うため，DIG-High Prime混合液やハイブリダイゼーションや検出のために必要な他の試薬がオールインワンのキットになった製品を以下にリストします.

製品名	カタログ番号	製品に含まれる試薬や内容の説明
DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (オールインワンのキット, DIG-High Prime(バイアル1)やプローブの収量を決定するための試薬(バイアル2, 3), サザンブロットへのプローブのハイブリダイゼーション用試薬(バイアル7), およびプローブとターゲットとのハイブリッドを化学発光検出するための試薬(バイアル4～6)が含まれる.	1 585 614	● DIG-High Primeラベリング混合液, 5×濃度(バイアル1)[1] ● DIGラベルされたコントロールDNA(バイアル2)[1] ● DNA希釈用バッファー(バイアル3)[1] ● アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体(バイアル4)[1] ● CSPD化学発光基質, ready-to-use(バイアル5)[1] ● ブロッキング溶液, 10×濃度(バイアル6)[1] ● DIG Easy Hyb顆粒(バイアル7)[1]

1これらのキット内容は単品試薬としても発売されています. 付録Eのご注文情報(188ページから)を参照ください.

プロトコールに追加で必要となる設備や試薬

設　備 / 試　薬	説明および目的
テンプレートDNA	● **高度に精製された**100 bp以上のDNAフラグメントまたは直鎖化したプラスミド/コスミド/ラムダDNAで, ラベルされるべきシークェンスを含むものを**使用してください.** ***ノート:*** このセクションに記されている操作方法は, 10 ng～3 μgのプラスミドDNAのラベルに使用することができます. ただし，必要な量のプローブを生成するためには，十分な量のテンプレートを使用するようにしてください. 例えば，複雑なゲノムからシングルコピー遺伝子を検出するためのプローブを調製する際には，少なくとも300 ngのテンプレートを使用してください.

設　備 / 試　薬	説明および目的
オートクレーブ 滅菌済みの再蒸留水	テンプレートDNAの希釈用
ストップバッファー	EDTA, 0.2 M, pH 8.0, 滅菌済み
氷 / 水入りの容器	DNAの変性用
ウォーターバス （複数必要）	以下の温度設定が必要です. ● 沸騰水, DNAの熱変性用 ● 37℃, ラベリング反応用 ● 65℃, 反応停止用

2. 1. 2 操作方法

ランダムプライムドラベリングのプロトコールは，以下のフローチャートに示す操作に分けられます．それぞれの操作の所要時間も以下のチャートに示します．

2.1.2.1 （45ページ）	**テンプレートの精製**	1.5時間～オーバーナイト
▼		
2.1.2.2 （47ページ）	**プローブのランダムプライムドラベリング**	1.3時間～オーバーナイト
▼		
2.1.2.3 （47ページ）	**プローブの収量の決定**	2 ～ 2.5時間

ノート：このアイコンは，その操作の後にプロトコールを中断して，その産物を次の操作を開始するまで一時的に保存することが可能であることを示しています．

2. 1. 2. 1 テンプレートの精製

最良の結果を得るために，全てのテンプレートの調製および精製を慎重に行うことをお薦めします．クローンされたインサートをラベリング反応のテンプレートに使用する場合は，分離したインサートにベクターのシークェンスが含まれないことが必要です．これは，ベクターのシークェンスがラベルされることにより，ターゲットDNA中にあるベクター様のシークェンスとの不要なクロス・ハイブリダイゼーションの可能性をなくすために重要です．
以下の表は，ランダムプライムドラベリング用テンプレート(プラスミドDNA)を高度に精製するために利用することのできる方法について，そのいくつかをリストしたものです．

精製の方法	解　説
塩化セシウム密度 勾配遠心分離	● 最も時間がかかるものの，高度に精製されたテンプレートを調製するには最良の方法です. ● オーバーナイトでの遠心分離が必要な場合があります. ● 精製後にDNAを制限酵素で消化し,ベクターのシークェンスからクローンされたターゲットのシークェンスを切り出します[1].
High Pure Plasmid Isolation Kit (Cat. No. 1 754 777)の使用	● 密度勾配による精製ができない場合の変法として薦められます. ● 所要時間はわずか30分間です. ● このキットを用いて精製されたテンプレートは，そのままラベリング反応に使用することが可能です. ● 精製された産物からは*E.coli*由来のDNAが除去されています. ● 精製後にDNAを制限酵素で消化し,ベクターのシークェンスからクローンされたターゲットのシークェンスを切り出します[1].
アガロースゲルからのDNAの 切り出し	● 最良の結果を得るため，High Pure PCR Product Purification Kit(Cat. No. 1 732 668またはCat. No.1 732 676)またはAgarose Gel DNA Extraction Kit(Cat. No. 1 696 505)のいずれかを用いてアガロースからDNAを分離してください[1]. ● Schleicher and Schuell社のElutipsは，アガロースからDNAを分離するための変法として利用することができます.
他社から発売されている 市販キットの使用	● *E.coli*由来プラスミドを調製する場合，精製プラスミドに*E.coli*の染色体DNAが混入しないようなキットを選んでください. ***ノート：****E.coli*染色体由来のシークェンスがテンプレート中に存在すると，ハイブリダイゼーションの結果，特異的(反復シークェンスとの相同性による)だが不要なシグナルを生じる可能性があります．**このような場合，PCR法など別のラベリング法を使用してプローブをラベルしてください.** ● キットを使用した後，精製されたDNAを最終的にフェノール/クロロフォルム抽出を行ってタンパクの残渣を除去してください．この残渣はラベリング反応を阻害することがあります. ● 有機溶媒による抽出の後，抽出されたDNAをエタノール沈殿させ，低濃度のTris(10 mM Tris, pH 7.5など)または再精製水中に懸濁させてください. 高濃度のEDTA(TEバッファー中など)は避けてください. これらはラベリングの酵素反応を阻害する可能性があります. ● 精製後にDNAを制限酵素で消化し,ベクターのシークェンスからクローンされたターゲットのシークェンスを切り出します[1].
クルードなプラスミド調製方法 の使用 (ミニ-プレップやマキシ-プレップ)	● これは最も短時間ですが，最適な結果を得にくい方法です. ● 精製後にDNAを制限酵素で消化し，ベクターのシークェンスからクローンされたターゲットのシークェンスを切り出します[1]. ● クルードなプラスミド調製物をラベリング反応のテンプレートに使用する場合，ハイブリダイゼーション実験の前にラベルされたプローブをHigh Pure PCR Product Purification Kit(Cat. No. 1 732 668または1 732 676)を用いて精製する必要があります(本章の50ページ，セクション 2.1.3.3「ラベルされたプローブを"きれい"にすることで，バックグラウンドを抑える」を参照ください).

1 スーパーコイル状や環状のプラスミドDNAを反応に使用することも可能ですが，直鎖化したDNAの方が一般的に良好な結果を示します. テンプレートの大きさが>5 kbの場合，(*Hae* IIIなどの) 4 bp 認識の制限酵素を用いて消化してください.

2. 1. 2. 2 プローブのランダムプライムドラベリング

実験を始める前に： DIGラベルされたプローブを必要量生成するために，十分量の高度に精製されたテンプレートがあるかどうか確認してください(このセクションの収量に関する表を参照)．通常，ブロット上でのシングルコピー遺伝子の検出には，ハイブリダイゼーション溶液1 ml当たり25 ngのラベルされたプローブが必要です．300 ng以上のテンプレート量から実験を始めることをお薦めします．
10 ngから3 μgの精製テンプレートDNAをラベルするには，以下の操作方法に従ってください．

ステップ	実験操作	時　間
①	以下の方法で試料を調製します ● 10 ng～ 3 μgのテンプレートDNA(直鎖化またはスーパーコイル状)を反応用バイアルに加えます． **ヒント:** 複雑なゲノム中のシングルコピー遺伝子を検出するプローブを調製する場合は，最低 300 ngのテンプレートを使用してください． ● オートクレーブ滅菌済みの再蒸留水を加え，最終容量を16 μlに調整します．	1 分間
②	以下の方法でDNAを熱変性します． ● 試料バイアルを沸騰しているウォーターバス中で10分間加熱します． ● 試料バイアルを直ちに氷 / 水の入った容器中で急冷します．	10分間
③	以下の方法でDNAをラベルします． ● DIG-High Primeをよく混ぜ合わせます． ● よく混ぜ合わせた，4 μlの DIG-High Primeを熱変性後の試料に加えます． ● 手短に遠心します． ● 試料を37℃にて 1 時間以上インキュベートします． ***Tip：*** テンプレートの量が少ない場合，インキュベーションをオーバーナイト(20時間まで)で継続し，ラベルされたプローブの収量を増加させることが可能です．	1 時間～オーバーナイト
④	以下の方法で反応を停止させます． ● 試料に 2 μlの 0.2 M EDTA(pH 8.0)を加えます．または， ● 試料を65℃にて10分間加熱します．	10分間

2.1.2.3 プローブの収量の決定

至適量のプローブを使用することは，ハイブリダイゼーションを成功させるためになくてはならない条件です．ラベルされたプローブの定量は，至適なプローブ量を決定するための最初のステップです．つまり，ラベリング反応が完了した後，ラベルされたプローブがどの程度得られたかを決定することが次のステップです．そのプローブを使用したハイブリダイゼーション反応を成功させるために，プローブ量の決定は必ず行わなければなりません．

ラベルされたプローブの収量を概算するための方法は，本章の75ページ，セクション2. 5「直接検出法によりプローブの収量を概算する」を参照ください．

ノート： ラベルされたプローブの量を概算するための参考として，次の表に最適なランダムプライムドラベリング反応においての代表的な収量を示します．これらは概算のみであり，それぞれのラベリング実験においてラベルされたプローブ産物の量に必ずしも反映するものではありません．

DIG-High Prime Labeling Mix を用いたランダムプライムドラベリングの収量

	以下の時間内で新たに合成されたDNAの量(ng)[1]	
精製されたテンプレートの量(ng)	1時間	20時間
10	45	600
30	130	1050
100	270	1500
300	450	2000
1000	850	2300
3000	1350	2650

1 上の表の収量は，最適な条件下で行われた20 μlのラベリング反応から期待される新たに合成されるDNA量を表しています．
反応の収量を増加させるためのヒントについては，次のセクション 2.1.3.1を参照ください．

2. 1. 2. 4 次に行うこと

何をしたいか		どうすればよいか，また，本書のどこを見ればよいか
ランダムプライムド法でラベルされたプローブを用いて得られた主な実験結果を見たい．	⇒	付録 B,171ページの「シングルコピー遺伝子の検出をより簡単に最適化するには」を参照ください．
ラベルしたプローブを使用してサザンまたはドットブロット上のDNAを検出したい．	⇒	本章の84ページ，セクション 3.1「DNAプローブのサザンブロットへのハイブリダイゼーション」を参照ください．
ラベルしたプローブを使用して，細菌やファージのライブラリー中からリコンビナント・クローンを検出したい．	⇒	本章の126ページ，セクション 6.1「DIGラベルされたプローブをコロニー / プラークハイブリダイゼーションに使用」を参照ください．
ラベルしたプローブを後に使用するために保存したい．	⇒	ラベルしたプローブを−20℃で保存してください． ***Tip：***ラベルされたプローブは−20℃保存下で少なくとも 1 年間安定です．多くの場合，ラベルされたプローブの安定性はかなり長いとされています(多くは 4 年程度まで)．

2.1.3 ランダムプライムドラベリングから最良の結果を得るために

2.1.3.1 ランダムプライムドラベリングにおける大切なヒント

要　素	ヒント
テンプレートの精製	●ラベリング効率はテンプレートDNAの精製度に大きく依存します．ラベリング反応が上手くいかない場合の多くは，テンプレートの純度が不十分であることに起因しているようです． ●最良の結果を得るためには，ラベリングの前にテンプレートDNAを直鎖化し変性させる必要があります．クローンされたインサートは，ベクターのシークェンスを全く含まない状態でラベリング反応のテンプレートに使用するのが理想的です．
テンプレート量	●必要とするプローブ量を生成するため，十分な量のテンプレートを使用するか，あるいは反応時間を十分長くとるようにしてください(操作2.1.2.2の収量に関する表を参照)． ●一定量のテンプレートからのラベリング効率を，以下の方法により著しく増加させることが可能です． ●プローブのラベル時間を長くします．テンプレート量が少ない場合，プローブをオーバーナイト(20時間まで)でラベルします． ●ラベリング反応を200〜300 μlにスケールアップします(ただしテンプレート量は増やしません)． ***ノート：***反応をスケールアップすると，新たに合成されるDNAの量は反応中のテンプレートDNA量を事実上上回り，生成されるプローブ量が効果的に増幅されます．この現象の正確なメカニズムはまだわかっていませんが，Klenow酵素によりDNA鎖の置換が生じ，テンプレートの複製がより速く行われるからではないかとされています．
ラベルされたプローブ	●ランダムプライムド法は，非常に短いDNAプローブでもラベルすることが可能です．しかし，非常に短いプローブのラベリングで最良の結果を得るには，PCRラベリング法を使用する方がよいでしょう(本章のセクション2.2を参照)． ●ランダムプライムドラベリングにより調製されたプローブは，単一のDNAではなく種々の長さのフラグメントの集合体です． これは以下の事柄を意味します： ●ランダムプライムド法でラベルされたプローブは,完全長のテンプレートDNAよりも短くなります． ***例：***2 kbのテンプレートからラベルされたフラグメントは，300〜1500 bpの長さを持ち，その大部分はおよそ800 bpになります． ●ラベルされたプローブは，電気泳動ゲルでは特定のバンドというよりも「スメアな」状態で見えます．

2. 1. 3. 2 ランダムプライムドラベリング法のトラブルシューティング

トラブルとなる問題	原因と考えられること	薦められる解決方法
プローブのラベリング効率が低い.	ラベリング条件が最適でない	● インキュベートの時間を長めにして，ラベリング反応をもう一度行ってください(オーバーナイトまで). ● テンプレート量は同じままで，反応容量を増やしてください．反応溶液中のテンプレート以外の組成を容量の増加に比例してスケールアップしてください. ● テンプレートを沸騰水の入ったウォーターバスで変性させてください.
	テンプレートの純度が十分でない.	● 高度に精製されたテンプレートのみを使用してください. ● テンプレートの調製は，操作2.1.2.1のガイドラインに従ってください. ● ラベリングを行う前に，テンプレートDNAをフェノール/クロロフォルム抽出しエタノール沈殿により精製してください.
化学発光検出において高いバックグラウンドを生じる (本章のセクション4.1)	ラベリングが効率よくできていない.	上記「プローブのラベリング効率が低い」の解説を参照ください.
	その他の理由	本章の105ページ,セクション3.3.2の「ハイブリダイゼーションブロットに関するトラブルシューティング」を参照ください.

2. 1. 3. 3 ラベルされたプローブを"きれい"にすることで，バックグラウンドを抑える

クルードなプラスミド調製試料を，ランダムプライムドラベリング反応のテンプレートとして使用したい場合があるかもしれません．弊社での実験から，このようなクルードな調製試料でも，ラベルされたプローブを最初にHigh Pure PCR Product Purification Kit（Cat. No. 1 732 668 または1 732 676）を用いて精製することで使用できることが示されています．このキットは，高いバックグラウンドを生じる「きれいでない」ランダムプライムドラベルされたプローブの成分を取り除くために理想的であることが分かっています(図9に事例が示されています).

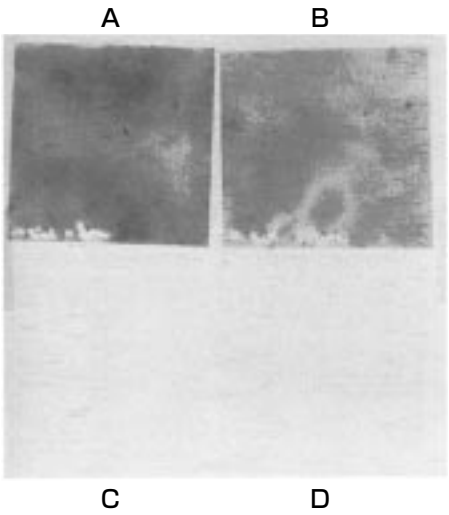


図 9. ランダムプライムドラベルされたプローブにより生じる強いバックグラウンドの除去にHigh Pure PCR Product Purification Kitを用いた例.
非常に「きれいでない」(タンパクが含まれるなど)プラスミド調製試料(フェノール抽出をせずボイリング法で調製したもの)をランダムプライムドラベリングのテンプレートとして使用した. 非特異的なバックグラウンドをテストするため, このラベルされたプローブをモックハイブリダイゼーション中にて(パネルA)ターゲットを含まないブロッティングメンブレンと反応させた. このハイブリダイゼーション溶液では, DIG Easy Hyb 1 ml 当たり25 ngのラベルされたプローブが用いられた. 標準的なストリンジェンシー洗浄により結合しなかったプローブが除去された. 洗浄後にメンブレン上に残ったプローブを免疫化学的に検出, 可視化させた. セルロースアセテート製フィルターでろ過したプローブ(パネル B), High Pure PCR Product Purification Kitを用いて精製したプローブ(パネル C), High Pureキットで精製し, かつろ過したプローブ(パネル D)をそれぞれ用いてこのモックハイブリダイゼーションをもう一度行った.
結果:精製なしで直接プローブを使用した場合, メンブレン上に強いバックグラウンドが生じた(パネル A). プローブを0.45 μmの滅菌済みセルロースアセテート製フィルターでろ過した後でも, プローブは強いバックグラウンドを生じた(パネル B). しかし, プローブをHigh Pure PCR Product Purification Kitを用いてきれいにした後, 精製されたプローブからはほとんどバックグラウンドが生じなかった(パネル C, D).
結論:High Pure PCR Product Purification Kit(精製時間, 10分間)が,きれいでないランダムプライムドラベルされたプローブから,バックグラウンドを生じる構成分を取り除いた(パネル C). さらに処理を行う必要 (セルロースアセテート製フィルターでろ過など, パネル D)はない.

2. 2 PCR法によるDNAプローブのラベリング

PCRラベリングは, テンプレートが少量の場合や, 部分的にしか精製されていない場合, あるいは非常に短い場合において, DIGラベルされたプローブを調製するための方法として薦められるようになりました. この方法は他の方法に比べて最適化する必要性が少なく, ラベルされたプローブを高収量で合成します.
PCRラベリングでは, 耐熱性ポリメラーゼがDIG-dUTPを取り込みながら, テンプレートDNAの特異的なサイトを増幅させていきます. その結果, 効率よくラベルされた非常に特異的かつ感度の高いハイブリダイゼーション用プローブが得られます. このセクションでは,DNAプローブをラベルするためのPCR DIG Probe Synthesis Kitの使い方について解説します.
このセクションのトピックは次の通りです.

トピックの情報		ページ
PCRラベリングに必要な材料	⇒	52
操作方法： ● プローブのPCRラベリング ● ラベルされたプローブの合成を確認する ● 次に行うこと	 ⇒ ⇒ ⇒	 53 57 58
PCRラベリングから最良の結果を得るために： ● PCRラベリングにおける大切なヒント ● PCRラベリング法のトラブルシューティング ● テンプレート濃度は，特異的なプローブを合成するための最も大切な要因である	 ⇒ ⇒ ⇒	 58 59 60
PCRにより生成されるDIGラベルプローブを用いた代表的な実験結果	⇒	61

2. 2. 1 PCRラベリングに必要な材料

PCRラベリングに必要とされる主な製品

製品名	カタログ番号	製品に含まれる試薬や内容の説明
PCR DIG Probe Synthesis Kit	1 636 090	● Expand High Fidelity酵素ミックス（バイアル 1） ● PCR DIGプローブ合成ミックス，10 × 濃度（バイアル 2） ● $MgCl_2$を含むPCRバッファー，10 × 濃度（バイアル 3） ● dNTPストック溶液, 10 × 濃度（バイアル 4） ● コントロール用テンプレート，ヒトtPA（バイアル 5） ● コントロール用PCRプライマーミックス，ヒトtPA（バイアル 6）

プロトコールに追加で必要となる設備や試薬

設　備 / 試　薬	説明および目的
テンプレートDNA	ラベルする目的のシークェンスを含み，部分的に精製されたDNAについて，以下のいずれかを使用してください. ● プラスミドDNA, 10〜100 pg（最適な量は10 pg） ● ジェノミックDNA, 1 〜 50 ng（最適な量は10 ng） ***ノート：***PCRラベリングでは他のラベリング法に比べて，テンプレートの精製度はそれほど重要ではありません. 例えば, どのような「クイックプレップ」法で調製される部分的に精製されたプラスミドも，テンプレートとして使用可能です. ただし, 最良の結果を得るためには，High Pure PCR Template Preparation Kit（Cat. No. 1 796 828）などDNA精製用キットを利用して迅速にテンプレートを精製してください.
PCRプライマー	ラベルする目的のシークェンスを増幅させるためのプライマーについて，以下が必要となります. ● 上流サイト用プライマー, 0.1 〜 1 μM溶液 ● 下流サイト用プライマー, 0.1 〜 1 μM溶液
ミネラルオイル	● 増幅反応液の上層を覆い，反応液の蒸発を防ぎます（サーマルサイクラーのタイプにより，必要でない場合があります）.
アガロースミニゲル用試薬	● ラベルされたプローブの合成をチェックするために使用します.

2. 2. 2 操作方法

PCRラベリングのプロトコールは，以下のフローチャートに示す操作に分けられます. それぞれの操作の所要時間も以下のチャートに示します.

2.2.2.1 （53ページ）	***プローブのPCRラベリング*** *ステージA：テンプレートの調製* *ステージB：テンプレート - プライマーセットのそれぞれに対しPCRパラメータを最適化* *ステージC：DIG-dUTP存在下でテンプレートを増幅*	20〜30分間 多様 約 2 時間
2.2.2.2 （57ページ）	***ラベルされたプローブの合成を確認する***	約 1 時間

ノート: このアイコンは，その操作の後にプロトコールを中断して，その産物を次の操作を開始するまで一時的に保存することが可能であることを示しています.

2. 2. 2. 1 プローブのPCRラベリング

次の方法を使用して10 ngのジェノミックDNAまたは10 pgのプラスミドDNAをラベルします．この反応から，650cm²のブロッティングメンブレンを解析するために十分な量のラベルされたプローブを合成することが可能です．

ノート： バイアルの番号はPCR DIG Probe Synthesis Kitの内容に対応しています．

ステップ	実験操作		時　間
①	ターゲットの抽出源に応じて，以下のいずれかの方法でテンプレートDNAを調製してください．		20〜30分間
	ターゲットの抽出源	**テンプレートの精製方法**	
	血液，buffy coat, 培養細胞, 組織，マウス尾，酵母，細菌またはパラフィン包埋組織切片由来のジェノミックDNA	High Pure PCR Template Preparation Kit[1]	
	細菌培養由来のプラスミドDNA	● High Pure Plasmid Isolation Kit[1] または ● 細胞をボイリングさせるなどの，シンプルな方法を含めた種々の「クイックプレップ」法	
	ウィルスDNA	High Pure Viral Nucleic Acid Kit[1]	
	1 ご注文情報は，付録の193ページを参照ください．		
②	ターゲットの増幅反応を最適化させるため，分離したターゲットDNAとデザインしたPCRプライマーとを用いて一連の「テストPCR」（例えば，Mg^{2+}の濃度を変えてみたり，サーマルサイクラーのプログラムを変えてみるなど）を行ってください．（初期実験での使用に薦められる増幅条件については，ステップ 6 を参照ください．） ***ノート：*** PCRの最適なガイドラインや操作法については，弊社のPCRアプリケーションマニュアル（最新版）の第 2 章を参照ください．		多様

ステップ	実験操作					時　間
③	実験用またはコントロール用1試料当たり，滅菌済みマイクロ遠心チューブに以下の構成分を加えてください.チューブを氷上に置いた状態でピペット操作を行ってください.					5分間
	試　薬	**DIGラベルされた実験用プローブ[1]**	**ラベルされていないコントロール用プローブ[2]**	**DIGラベルされたtPAコントロール用プローブ[3]**	**最終濃度**	
	滅菌再精製水	適　宜	適　宜	29.25 μl	-	
	$MgCl_2$を含むPCR用バッファー，10×濃度（バイアル3）	5 μl	5 μl	5 μl	1×[4]	
	PCR DIGミックス，10×濃度（バイアル2）	5 μl	-	5 μl	200 μM dNTPs	
	dNTPストック溶液，10×濃度（バイアル4）[5]	-	5 μl	-	200 μM dNTPs	
	上流サイトと下流サイトのプライマー	適宜	適宜	5 μl（バイアル6）	プライマー各0.1〜1 μM	
	Expand High Fidelity酵素ミックス（バイアル1）	0.75 μl	0.75 μl	0.75 μl	2.6ユニット	
	テンプレートDNA	適宜	適宜	5 μl（バイアル5）	● ジェノミックDNA 10 ng，または ● プラスミドDNA 10 pg	
	全反応容量	50 μl	50 μl	50 μl		
	1 実験用の試料は，ハイブリダイゼーション用プローブとして使用するためにDNAをラベルするためのものです. 2 ラベルされていない陽性コントロールは，反応ミックス2つまりDIG-dUTPを含まないことから，実験用試料の対照となります. ***ノート:*** このコントロールは，プローブのラベリングの評価に必要です（操作2.2.2.2）. 3 ラベルされた陽性コントロールでは，ヒト組織プラスミノーゲンアクチベーター（tPA）のシークェンスを認識する，ラベルされたプローブが生成されます. 4 実験の最適化（ステップ2）の結果に応じ，最適な増幅反応を得るために$MgCl_2$の濃度を調節します. 5 ***Tip：*** バイアル4のヌクレオチドは，ラベリングや増幅反応においてDIG-dUTP濃度を調節するためにも使用することが可能です（セクション2.2.3.1参照）.					
④	試薬を混合し手短に遠心して，試料をチューブの底に集めます.					1分間

<table>
<tr><th>ステップ</th><th>実験操作</th><th>時　間</th></tr>
<tr><td>⑤</td><td>それぞれの反応試薬液に100 μlのミネラルオイルで重層し，サーマルサイクリングの過程で試薬が蒸発することを防ぎます．
Tip：サーマルサイクラーにトップヒーターがある場合，ミネラルオイルで重層する必要はありません．</td><td>—</td></tr>
<tr><td>⑥</td><td>それぞれの試料をサーマルサイクラーに設置し，PCRをスタートさせます．先のステップ 2 で決定した最適な増幅条件を使用してください．
Tip：最適な増幅条件は，テンプレート，プライマー，およびサーマルサイクラーの組み合わせに依存します．最良の結果を得るために，テンプレートとプライマーの組み合わせに対してPCRを至適化させる必要があります（ステップ2参照）．ただし，初期実験を良好にスタートさせるためには，以下に示す条件が有効です．これらは 3 kbのフラグメントを増幅させるためにデザインされています．
<table>
<tr><th></th><th>温　度</th><th>時　間</th><th>サイクルの回数</th></tr>
<tr><td>**最初の熱変性**
（第 1 サイクルの前）</td><td>95℃</td><td>2 分間</td><td>—</td></tr>
<tr><td>**熱変性**
アニーリング
伸長反応</td><td>95℃
60℃
72℃</td><td>30秒間
30秒間
40秒間</td><td>第 1 ～ 10
サイクル</td></tr>
<tr><td>**熱変性**
アニーリング
伸長反応</td><td>95℃
60℃
72℃</td><td>30秒間
30秒間
40秒間 +
各サイクル数
毎に20秒ずつ
増やす[1]</td><td>第11 ～ 30
サイクル</td></tr>
<tr><td>**最終的な伸長反応**</td><td>72℃</td><td>7 分間</td><td>—</td></tr>
</table>
1 伸長反応時間は，長い（= 3 kb）フラグメントのみ増加させる必要があります．短いフラグメントに対しては，30サイクル全てに40秒間の伸長反応を適用してください．</td><td>1.5時間</td></tr>
<tr><td>⑦</td><td>以下の操作を行ってください：
● 反応終了後の混合液から 5 μlを用いて反応の結果をチェックします（操作方法は以下の 2.2.2.2を参照）．
● 残りの反応混合液を，次に使用するまで 4℃で保存します．
ノート：PCRにより合成されたプローブは非常に純度が高く，直接ハイブリダイゼーション反応に使用することが可能です．つまり精製の必要はありません．</td><td>—</td></tr>
</table>

2. 2. 2. 2 ラベルされたプローブの合成を確認する

ステップ	操　作	時　間
①	それぞれの反応毎に少量(5 μl)を，DNA分子量マーカーとともにTAEまたはTBEバッファー中にてアガロースミニゲル電気泳動します.	約30分間
②	0.5 μg/mlの臭化エチジウム(EtBr)を用いてゲルを染色します.	30分間
③	ゲル上のバンドを調べます．ラベリング反応がうまくいっていれば，以下のように見えるはずです： A. tPAコントロール用プローブは，明らかに500～550 bpのサイズを示します. ***ノート:*** 増幅産物の正確なサイズは442 bpです．DIGラベルされたDNAはラベルされていないDNAに比べてゲル中での移動速度が遅くなります. B.ラベルされた実験用プローブとラベルされていないコントロール用プローブの両方が，ゲル上で明らかに見られます. C.ラベルされていないコントロール用プローブは，予想されるサイズで現れます. D.ラベルされた実験用プローブは，ラベルされていないコントロール用プローブに比べて(DIGが存在することにより)ゲル中での移動が遅くなります(大き目のバンドとして見られるなど). E.ラベルされたDNAのEtBr染色は，ラベルされていないコントロールDNAに比べて(DIGが存在することにより)同等または弱くなります.	―
④	ステップ 3 における条件 B ～ E が満たされていれば，プローブはうまくラベルされています(図10参照)．このプローブを，ブロットのハイブリダイゼーション用プロトコールが薦める濃度**(ハイブリダイゼーション溶液 1 ml当たり 2μl)**で使用してください. ***ノート：***ラベルされたPCR産物のゲル上でのバンド量が非常に多い場合，ハイブリダイゼーションバッファー 1 ml 当たり最少0.5 μl まで濃度を下げることが可能です. シグナルが逆にとても弱い場合, ハイブリダイゼーションバッファー 1 ml 当たり 4 μl まで濃度をあげることが可能です.	―

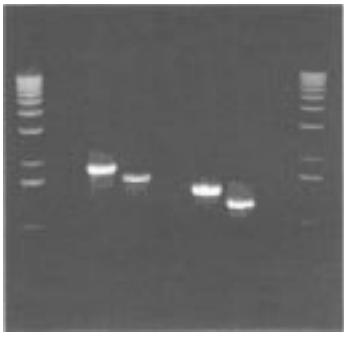


図10. アガロースゲル電気泳動によるPCRラベルされたプローブの評価. このアガロースゲル上では，ラベルされたPCR産物の分子量はラベルされていない産物よりもはるかに大きくなった(これはDIGを用いた高密度ラベリングによる).
結果：ラベルされた産物とラベルされていない産物とは，電気泳動ゲル上を別々のバンドのように移動した. 分子量のシフトやラベルされたプローブ量は概ね同等である(あるいはラベルされていないプローブのバンドよりもやや量が少ない)ことが観察されれば，ラベリング反応は成功している．プローブを薦められる量(ハイブリダイゼーションバッファー 1 ml 当たり 2 μl)にてハイブリダイゼーション反応に使用することが可能である.

2. 2. 2. 3 次に行うこと

何をしたいか		どうすればよいか，また，本書のどこを見ればよいか
PCR法でラベルされたプローブを用いて得られた代表的な実験結果を見たい.	⇒	本章の61ページ，セクション 2.2.4を参照ください.
ラベルしたプローブを使用してサザンまたはドットブロット上のDNAを検出したい.	⇒	本章の84ページ，セクション 3.1「DNAプローブのサザンブロットへのハイブリダイゼーション」を参照ください.
ラベルしたプローブを使用して，細菌やファージのライブラリー中からリコンビナント・クローンを検出したい.	⇒	本章の126ページ，セクション 6.1「DIGラベルされたプローブをコロニー / プラークハイブリダイゼーションに使用」を参照ください.
ラベルしたプローブを後に使用するために保存したい.	⇒	ラベルしたプローブを−20℃で保存してください. *Tip：*ラベルされたプローブは−20℃保存下で少なくとも１年間安定です.

2.2.3 PCRラベリングから最良の結果を得るために

2.2.3.1　PCRラベリングにおける大切なヒント

要　素	ヒント
PCR条件	● DIGを取り込ませる前のDIG-dUTPを**含まない**状態において，それぞれのテンプレートとプライマーとの組み合わせに対してPCRの増幅パラメータ（サイクル条件,テンプレート濃度,プライマーのシークェンスと濃度）を至適化させます.
テンプレート	● 最良の結果を得るために，クローンされたインサートをテンプレートとして使用してください．ジェノミックDNAはより扱いにくいことがあります. ● テンプレート濃度は，特異的なプローブの生成を成功させる重要なカギとなります（図11を参照）.
ラベリング反応	● PCR DIG Probe Synthesis Kitは他の多くのラベリング法に比べて反応条件を最適化させる必要性が少ないです. これは, キットに含まれる酵素ブレンドExpand High Fidelityによるためです. この酵素ブレンドには, 以下の特色があります： ●GC-リッチ領域をテンプレートとして効果的に使用することが可能です. ●多くのテンプレートに対して,$MgCl_2$の濃度を最適化させる必要がありません. ラベリング反応の大部分は，標準的な1.5 mM $MgCl_2$濃度が適用されます. ●DNAテンプレートの中には，標準的な濃度のDIG-dUTP（50 μlの反応液中に加えたPCR DIG Probe Synthesis Mix［バイアル2］5 μlに含まれる0.07 mMなど）存在下では効果的に増幅されないもの（特にGC含有量が高いものや長いテンプレートの場合）があります.これらのテンプレートに対しては，PCR DIG Probe Synthesis KitのdNTPストック溶液（バイアル 4）を使用して反応液中のDIG-dUTPの濃度を変えてください（次のセクション 2.2.3.2, 最良のヌクレオチド比についての詳説を参照）.

2. 2. 3. 2 PCRラベリング法のトラブルシューティング

トラブルとなる問題	原因と考えられること	薦められる解決方法
DIGラベルされたPCR産物の収量が低い.	PCRが最適でない.	● DIGを取り込ませる前のDIG-dUTPを**含まない**状態において，常にそれぞれのテンプレートとプライマーとの組み合わせに対してPCRの増幅パラメータ(サイクル条件，テンプレート濃度，プライマーのシークェンスと濃度)を至適化させてください.
	反応中のDIG-dUTP量が多すぎる[1].	反応中のDIG-dUTPの濃度を低くしてください．これは，長いテンプレートに対して特に重要です．以下に一般的な方法を記します： ● DIGプローブ合成用ミックス(PCRキットのバイアル 2)における1 : 3 比率(DIG-dUTP : dTTP)は，1 kbまでの長さのプローブのラベリングに適しています. ***ノート：***短い(< 1 kb)プローブ(特にGC含有量の高いもの)では，1 : 3 比率よりも 1 : 6 比率の方が効率よくラベルされることが観察されています．したがって，1kbに満たないプローブを新たにラベルする場合は，初めに両方の比率で実験を行ってください. ● 1 ～ 3 kbのプローブでは，DUG-dUTP : dTTPが 1 : 6 比率の条件下でラベリングを行ってください. ***ノート：*** 1 : 6 比率のラベリング混合液は，簡単に調製することが可能です．PCR DIG Probe Synthesis Mix (バイアル 2)(1 : 3 比率)とdNTPストック溶液(バイアル 4)(DIG-dUTPを含まない)を等量混ぜ合わせてください. ● 3 kbを上回る長さのプローブに対しては，さらに低濃度のDIG-dUTPを用いてラベリングを行ってください(最高濃度 1 : 6 から 1 : 10 程度まで). ***ヒント：***3 kbを上回るプローブのラベリングでは，PCRキットに含まれるExpand High Fidelity Systemに代わりExpand Long Template Systemを使用します. ***ノート：***上記の低濃度のDIGがハイブリダイゼーション用プローブの最終的な感度に影響することはありません. ***Tip***：このラベリング反応で 1 : 20比率のPCR DIG Labeling Mix(Cat. No. 1 585 550)を使用しないでください. この比率はプローブの感度に影響します (詳しくは，第 3 章のセクション 6.3を参照ください).
ブロット上にスメアなハイブリダイゼーションを生じる.	PCRにおけるテンプレート濃度が高すぎる[2].	● 最良の結果を得るために，ごく少量のテンプレートを使用してください．プラスミドDNAでは10 pg，ジェノミックDNAでは10 ng が理想的な量です. ● 可能であるなら，複雑なジェノミックDNAではなくクローンされたインサートをテンプレートとして使用してください.
	その他の理由による.	● 本章の105ページ，セクション 3.3.2 の「ハイブリダイゼーションブロットに関するトラブルシューティング」を参照ください.

1 テンプレート中のDIGラベルされたヌクレオチドは，ポリメラーゼの反応速度を低下させます．これは，増幅時の次の反応サイクルを開始させるために必要なプライマーのシークェンスを有する，完全長の産物を合成するためのポリメラーゼ活性を低下させることにつながります. テンプレートの長さが長くなるほど，この作用は大きくなります.

2 テンプレートが多すぎると，第 1 伸長反応の産物(プライマーで特異化されたサイトを通過したもの)がともに増幅される現象につながります. これら第 1 伸長反応の産物には，反復シークェンスや第 2 反応でプライミングサイトとは無関係のシークェンス(ジェノミックDNAの場合)，あるいはベクターのシークェンス(プラスミドDNAの場合)が含まれる可能性があります．ハイブリダイゼーションのアッセイにおいて，プローブがベクターやジェノミックDNAのシークェンスとクロス-ハイブリダイズした結果，プローブとターゲットとのハイブリッドがスメアな状態で現れることになります. テンプレートが多すぎた場合の影響について，図11の例を参照ください.

2. 2. 3. 3 テンプレート濃度は，特異的なプローブを合成するための最も大切な要因である

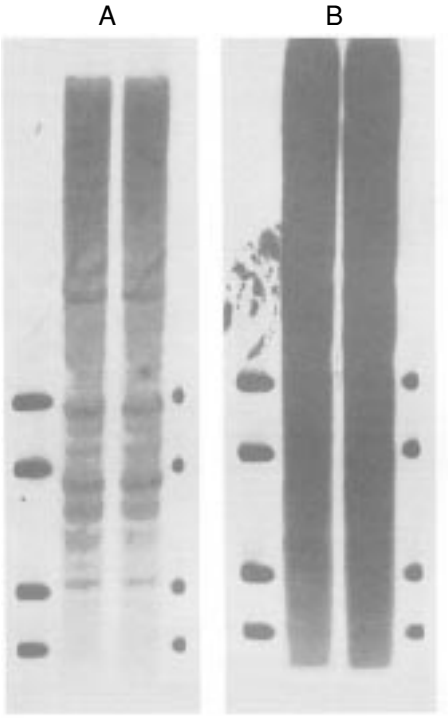


図11. PCRにより合成されたヒトDNA由来のハイブリダイゼーション用プローブの特異性に対する，テンプレートDNA濃度の影響. この実験はPCRにおけるテンプレート濃度が特異性の高いプローブの生成に非常に重要であることを示している．2種類のプローブ（tPAのシークェンスおよびcystic fibrosis関連のシークェンスを検出するもの）を，500 ngのヒトジェノミックDNAから直接調製した（これは，他のPCRのアプリケーションに通常使用されている量であるが，DIGラベリングで薦められる量よりも50倍多い）．テンプレートDNAをあらかじめ制限酵素*Not* Iで消化し，PCR反応に適した長さのフラグメントを作成した．ラベリング後，プローブはサザンブロット上の*Pvu* II消化されたヒトジェノミックDNA（2.5 μgおよび 5.0 μg）のシークェンスの検出に使用された．ハイブリッドは免疫化学的に検出され，化学発光基質CSPDを用いて可視化された（露光２時間）．
結果： 試料 2.5 μg［A］および 5.0 μg［B］ハイブリダイゼーションパターンに多くのバンドが含まれます．実際，このバンドパターンはDNAフィンガープリントに類似しています．これは，反復シークェンス（「フィンガープリント」のパターンをもたらす）を含む最初の伸長産物が高濃度に存在したことから，プローブの特異性が失われたと結論づけられます．またプローブが二次的なプライミングサイトから合成された産物を極めて多量に含んでいることも考えられます．反復の要素や二次的な産物が多量に存在することは，つまり最初のテンプレート濃度が高いということになり，ゲル電気泳動による精製を経ても，その特異性は改善されません．
結論： PCRにおけるテンプレート濃度は，特異的なプローブを合成する際に最も重要なファクターになります．一般にジェノミックDNAで最大10 ng（プラスミドのクローンDNAで10 pg）をテンプレートとして使用してください．

2. 2. 4 PCRにより合成されるDIGラベルプローブを用いた代表的な実験結果

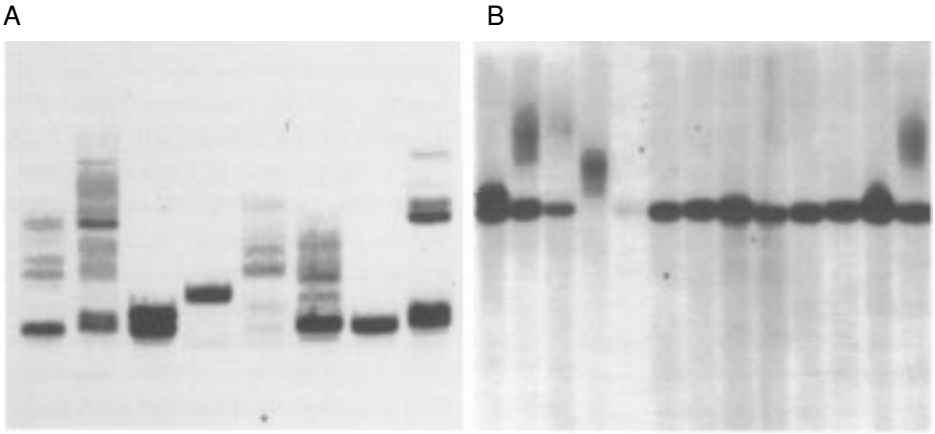


図12. DIGラベルされたプローブを用いたFragile Xの検出. Fragile X は遺伝病の 1 つで，X 染色体上でのCGGトリプレットの反復数の増加をもたらす．この症候群が X 染色体のみに作用することから，この疾患における症状は主に男性に現れ，女性は無症候性のキャリアーになる．

トリプレットの反復数が高くなり過ぎると，反復領域が不安定になり壊れる傾向がみられる．つまり，染色体解析で観察すると X 染色体が「壊れやすい（fragile）」パターンを示す．また，反復数は増加するものの個体としては無症候性である前変異段階も存在する．Fragile X 症候群の存在についての診断テストをサザンブロット上で行うことが可能である．

この図はサザンブロットによるFragile X 症候群のテストを示している．何人かの患者のDNAを，Fragile X DNAに特異的な 1 kbのラベルされたプローブとハイブリダイズさせた．図は，健常者数名，Fragile X 変異のヘテロ接合体である女性患者 1名，前変異段階のFragile X 男性患者 1 名，そしてFragile X の変異が完全に展開している男性患者1名から得られた結果を示す．

テストには 2 種類の異なるハイブリダイゼーション用プローブが使用された．1 つは ^{32}Pを用いてラジオアクティブ・ラベルされ（B），もう 1 つはPCR DIG Probe Synthesis Kitを用いてDIGラベルされた（A）ものであった．サザンブロットによる解析とプローブとターゲットとのハイブリッドの検出には，標準的な方法が用いられた．ターゲットの試料は，ラジオアクティブ・ラベルされたプローブとDIGラベルされたプローブを使った実験とで全く同じにはならないことに注目したい（データは， Dr. Halley, Erasmus University, Rotterdam, Netherlandsのご厚意により提供されたものである）．

結果：Fragile X 症候群の患者から採取したDNA中では，ブロット上での健常者に見られる対立遺伝子のバンドに加え，その上部にいくつかのバンドがスメアに現れている．この追加で現れるFragile X のバンドを，DIGラベルされたプローブを用いて検出した場合（A），診断上スメアとされる不連続なバンドが X-線フィルム上に現れる．プローブとターゲットとのハイブリッドの化学発光検出では，CDP-*Star*化学発光基質を用いたフィルムへの露光時間は，わずか20分であった．

この追加で現れるFragile Xのバンドを，ラジオアクティブ・ラベルされたプローブを用いて検出した場合（B），X-線フィルム上に区別されないスメアな状態が現れる．プローブとターゲットとのハイブリッドのシグナルを検出するには，ブロットを X-線フィルムにオーバーナイトで露光させる必要があった．

結論：標準的なPCRラベリングのテクニックでラベルされたDIGプローブは，Fragile X のバンドを容易に検出することが可能であった．DIGラベルされたプローブを用いて可視化させたバンド（写真A）は，ラジオアクティブ・ラベルされたプローブを用いて得られたバンド（写真B）に比べ，より鮮明であった．DIGラベルされたプローブにより得られた結果は，ラジオアクティブ・ラベルされたプローブを用いた結果とほぼ同等だが，結果を得るための所要時間は短いという利点がある．

2. 3 トランスクリプションによるRNAプローブのラベリング

アプリケーションによっては，DIGラベルされたRNAプローブが，DIGラベルされたDNAプローブよりも効果的である場合があります(72ページ，セクション 2.3.4参照)．例えば，DIGラベルされたRNAプローブは，トータルRNA中においてナノグラム程度の量の希少なmRNAを検出することが可能です(本章の113ページ，セクション4.1.4の図15を参照)．

DIGラベルされたRNAプローブは，DNAテンプレートから*in vitro*トランスクリプションにより生成されます．RNAのトランスクリプション法では，トランスクリプション用ベクター上の複数のRNAポリメラーゼプロモーター(T7, SP6あるいはT3 RNAポリメラーゼ)間にあるマルチクローニングサイト内にDNAがクローンされます．

ベクターを特定のサイト(インサート部分の近く)で切断し，テンプレートを直鎖化させます．RNAポリメラーゼのひとつが，リボヌクレオチド(DIG-UTPを含む)混合液存在下でインサートDNAをアンチセンスRNAコピーへと転写します．この反応中，DNAは何度も(100回程度まで)転写され，完全長のDIGラベルされたRNAコピーが大量に生成されます(標準的な反応により1 μ gのDNAから10〜20 μ gのRNAを生成)．

DIGは約25〜30ヌクレオチド毎にRNAへ取り込まれます．

このセクションでは，DIG Northern Starter Kitの内容物を使用してRNAプローブをラベルするための方法(トランスクリプション法)について解説されています．このセクションのトピックは以下の通りです．

トピックの情報		ページ
RNAプローブのラベリングに必要な材料	⇒	63
操作方法：		
●テンプレートの精製	⇒	66
●トランスクリプションによるRNAプローブのラベリング	⇒	68
●プローブの収量の決定	⇒	69
●次に行うこと	⇒	69
トランスクリプションによるラベリングから最良の結果を得るために		
●RNAプローブのラベリングにおける大切なヒント	⇒	70
●RNAラベリング法のトラブルシューティング	⇒	71
DIGラベルされたRNAプローブを用いた代表的な実験結果	⇒	72

2. 3. 1 RNAプローブのラベリングに必要な材料

RNAラベリングのための主要な製品

製品名	カタログ番号	製品の説明
DIG Northern Starter Kit（オールインワンのキット，操作に必要とされる試薬［バイアル 1 ～ 4, 6］，さらにプローブの収量概算やハイブリダイゼーション，化学発光検出のための試薬が含まれる．）	2 039 672	●ラベリング混合液, 5 × 濃度［バイアル 1a］ ●トランスクリプションバッファー, 5 × 濃度［バイアル 1b］ ●SP6 RNAポリメラーゼ, 20 U/μl［バイアル 2］[1] ●T7 RNAポリメラーゼ, 20 U/μl［バイアル 3］[1] ●T3 RNAポリメラーゼ, 20 U/μl［バイアル 4］[1] ●アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体［バイアル 5］[1] ●DNase I, RNaseフリー［バイアル 6］[1] ●CDP-*Star* 化学発光基質, ready-to-use［バイアル 7］[1] ●DIGラベルアクチンRNAプローブ［バイアル 8］[1] ●DIG Easy Hyb顆粒［バイアル 9］[1] ●ブロッキング試薬, 10 × 濃度［バイアル10］[1]

1 これらのキット内容は単品試薬としても発売されています．付録 E（188ページから）のご注文情報を参照ください．

プロトコールに追加で必要となる設備

試薬 / 装置 / 設備	説明および目的
操作全般に必要となるもの	
オートクレーブ滅菌済みかつDMDCまたはDEPC処理済の再蒸留水	●操作に必要となる試薬すべての調製のため．［DMDC = ジメチルジカーボネート, dimethyl-dicarbonate; DEPC=ジエチルピロカーボネート, diethyl pyrocarbonate］
200℃用オーブン	●ガラス器具を乾熱滅菌し，RNaseを不活性化させるため．
RNase ZAPまたは同様の製品	●実験台など実験環境におけるコンタミネーションを除去するため．
パウダーフリー手袋と滅菌済みピンセット	●実験器具や試薬をRNaseフリーで操作するため．
氷/水入りの容器	●試料や試薬の調製や保存のため．
ウォーターバス	以下の温度の設備が必要です： ●68℃, プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションバッファーを予め温めておくため． ●42℃, ラベリング反応用． ●37℃, DNase I 消化反応用．

試薬/装置/設備	説明および目的
クローニングによるテンプレートの調製に必要となるもの	
トランスクリプション用プラスミド（DIG RNALabeling Kit, Cat. No. 1 175 025に含む）	●転写するシークェンスをクローニングするため. ***ノート:*** プラスミドにはRNAポリメラーゼのプロモーターのシークェンス（SP6, T7またはT3）が必ず含まれていなければなりません.
Rapid DNA Ligation Kit（Cat. No. 1635 379）	●プラスミドへターゲットシークェンスをインサートするため.
コンピテント *E. coli* セル	●プラスミドを増幅させるため.
High Pure Plasmid Purification Kit（Cat. No. 1 754 777）	●*E. coli* からリコンビナントのプラスミドを精製するため.
制限酵素（弊社カタログを参照ください.）	●ターゲットシークェンスをトランスクリプション用プラスミドにクローンするため. ● トランスクリプションの前にプラスミドを直鎖化させ，5'末端のオーバーハングを形成させるため.
High Pure PCR Product Purification Kit*（Cat. No. 1 732 668 または 1 732 676）* またはフェノール, クロロフォルム, エタノール	●直鎖化させたプラスミドの除タンパクと濃縮のため.
2ステップRT-PCRによるテンプレート調製に必要なもの	
High Pure RNA Isolation Kit（Cat. No. 1 828 665）*	●トータルRNAを調製するため.
逆転写酵素（リバーストランスクリプターゼ）	● トータルRNAからテンプレートのcDNAを生成させるため. ***ノート：*** ロシュ・ダイアグノスティックス社から発売されている逆転写酵素の製品リスト全般については, PCRアプリケーションマニュアルまたはウェブサイト[http://www.roche-applied science.com]を参照ください.
PCR Nucleotide Mix（Cat. No. 1 581 295）*	●各dNTP, 10 mM
Expand High Fidelity PCR System（Cat. No. 1 732 641）**	●PCR増幅のためのポリメラーゼ混合試薬
RNAポリメラーゼのプロモーターシークェンス（SP6, T7またはT3）を含むPCRプライマー	●ターゲットのcDNAシークェンスの増幅のため.

* これらの製品はRoche Molecular SystemsとPerkin-Elmer Corporationとのライセンス契約に基づき販売されています. 完全なライセンス放棄に関しては，207ページの放棄 1 を参照ください.

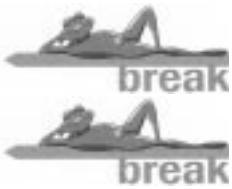
** これらの製品はRoche Molecular SystemsとPerkin-Elmer Corporationとのライセンス契約に基づき販売されています. これらの製品の購入には, それらを認可されたサーマルサイクラーと組み合わせたポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）のプロセスに使用するためのライセンスが付随します. 完全なライセンス放棄に関しては，206ページの放棄 2 を参照ください.

試薬/装置/設備	説明および目的
トランスクリプションによるラベリングに必要なもの	
テンプレートDNA	●ラベルされるターゲットシークェンスとRNAポリメラーゼ(SP6, T7またはT3)のひとつのプロモーターのシークェンスをもつ, 高度に精製された直鎖化DNA.ラベルされるシークェンスは最低 200 bp～1000 bpの長さが必要(1 kbが理想的)です. テンプレートDNAとしては, クローンされたターゲットのシークェンスとプロモーターを含む 1 μg, あるいは特異的に調製されたPCR産物 100～200 ngのいずれかを使用してください. ***注意：***テンプレートの精製は, ラベリング効率に厳密に作用します. 下記の操作におけるガイドラインに従い, テンプレートを調製してください.
ストップバッファー	●EDTA, 0.2 M, pH 8.0　滅菌済み

2. 3. 2 操作方法

RNAラベリングのプロトコールは, 以下のフローチャートに示す操作に分けられます. それぞれの操作の所要時間も以下のチャートに示します.

2.3.2.1 (66ページ)	**2 つの方法のいずれかによる** ***テンプレートの精製*** 方法 A：クローニングとプラスミドの精製 方法 B：RT-PCR	3 時間～ 2 日間 2.5時間(+プライマー合成)
▼		
2.3.2.2 (68ページ)	***トランスクリプションによる*** ***プローブのラベリング***	80分間
▼		
2.3.2.3 (69ページ)	**プローブの収量の決定**	2 ～ 2.5時間



ノート：このアイコンは, その操作の後にプロトコールを中断して, その産物を次の操作を開始するまで一時的に保存することが可能であることを示しています.

以下の操作ステップの全般において, RNaseによるコンタミネーションを避けるため, 次の方法に従ってください.

- ステップ全般を通じて, パウダーフリーの手袋を着用してください.
- 全ての溶液の調製に, DMDCまたはDEPC処理された水を使用してください.
- 全ての溶液を, オートクレーブまたはフィルター滅菌してください.
- できる限り, 使い捨てのプラスチック製器具や, 乾熱滅菌(200℃, 8 時間)済みのガラス器具, あるいはRNase *AWAY*や同様のコンタミネーション除去溶液を用いてコンタミネーションを除去したプラスチック製器具を使用してください.
- コンタミネーション除去溶液を用いて, 実験台のエリアを厳密に清浄してください.

2. 3. 2. 1 テンプレートの精製

テンプレートは，プローブに転写されるシークェンスとRNAポリメラーゼのプロモーター(SP6, T7,またはT3)を含み，精製されたDNAでなければなりません.

ノート：最適なテンプレートの長さは約1 kbです. 最少でも200 bpの長さが必要です.

テンプレートを調製するためには，2 通りの方法があります.

- プラスミドのRNAポリメラーゼ下流のサイトにターゲットシークェンスをクローンさせた後，プラスミドを精製して直鎖化させる(標準的な)方法.
- トータルRNAからRT-PCRによりDNAテンプレートを調製し，PCRのステップで必要とされるプロモーターのシークェンスを(PCR用プライマー内に包括させるなどして)付加させる方法.

それぞれの方法について，以下に概説します.

2. 3. 2. 1A 標準的な方法：クローニングとプラスミド精製によるDNAテンプレートの調製

ステップ	実験操作	時　間
①	精製済みのターゲットDNAをトランスクリプション用ベクターのRNAポリメラーゼ(SP6, T7,またはT3)プロモーターサイトの下流にあるマルチクローニングサイトにクローンさせます. ***ノート：***最良の結果を得るために, 弊社の制限酵素とRapid DNA Ligation Kitをご利用ください.	1.0 ～ 1.5時間
②	コンピテント*E.coli* セル中でプラスミドを増幅させます.	オーバーナイト
③	以下のいずれかの方法により，プラスミドを精製します. ● 塩化セシウム存在下における密度勾配遠心分離法，または ● High Pure Plasmid Isolation Kitの使用による方法	16時間, または 30分間
④	制限酵素を用いてプラスミドを直鎖化させ，5'末端オーバーハングを形成させます. ***ノート：*** 3'末端オーバーハングまたは平滑末端のテンプレートの場合，トランスクリプション反応において感度の低下とバックグランドの増加につながるラップ - アラウンド(wrap-around)産物を生成することがわかります.	1 時間
⑤	● 制限酵素反応の後，以下のいずれかの方法により，DNAを精製します. 　● フェノール/クロロフォルム抽出，または 　● High Pure PCR Product Purification Kitの使用 ● 精製した産物をエタノール沈殿させ, 滅菌, DMDCまたはDEPC処理水，あるいは10 mM Tris中に200～250 μgDNA/ mlにて再懸濁させます.	1 時間, または 10分間
⑥	1 μg(4～ 5 μl)の精製され直鎖化されたプラスミドをテンプレートとして，操作 2.3.2.2(ラベリング)を行います.	

2. 3. 2. 1B　RT-PCRによるトータルRNAからのDNAテンプレートの調製

ステップ	実験操作			時　間
①	弊社のHigh Pure RNA Isolation Kitを用いるなど，標準的なテクニックによりトータルRNAを調製します.			30分間
②	オリゴ[dT]プライマーと適切な逆転写酵素（リバーストランスクリプターゼ）を用いて，トータルRNAの逆転写を行います.			1.25時間
③	転写されるターゲットのシークェンス（x-mer）と以下のRNAプロモーターのいずれかのシークェンスに相補的なシークェンスを含む一対のPCRプライマーを合成します.			0.5～1日
	RNAポリメラーゼ	**プロモーターのシークェンス**		
	SP6	SP6ポリメラーゼでは，プロモーターのシークェンスがプラスミド環境内にある場合にのみ効率よいトランスクリプションが開始されるため，SP6プロモーターと同じシークェンスをPCRにより生成されたDNAフラグメントに使用することは薦められません.		
	T7	5'TAATACGACTCACTATAGGG または 5"TAATACGACTCACTATAGGA		
	T3	5'AATTAACCCTCACTAAAGGG		
④	滅菌済みRNaseフリーのマイクロ遠心チューブ（氷上に設置）に,以下の試薬を（リストされる順序に従って）加えます.			5分間
	試　薬	**容　量**	**最終濃度**	
	再蒸留水, RNaseフリー	多様		
	Expand High Fidelityバッファー，10×濃度	5 μl	1×濃度， 1.5 mM $MgCl_2$	
	ヌクレオチド混合液 （各dNTP, 10 mM）	1 μl	各dNTP, 0.2 mM	
	プライマー1（センス）	多様	300 nM	
	プライマー2（アンチセンス）	多様	300 nM	
	Expand High Fidelity酵素ミックス[1]	0.75 μl	2.6 U	
	cDNA（上記ステップ2より）	2 μl		
	全体の容量	**50 μl**		
	1 Expand High Fidelity酵素ミックスは,最大5kbのターゲットを増幅させることが可能です.			
⑤	チューブをおだやかにヴォルテックスし，チューブ内の溶液を均一にさせた後，手短に遠心してチューブの底に試料を集めます.			1分間

ステップ	実験操作	時　間
⑥	100 μlのミネラルオイルで反応試薬液を重層し，サーマルサイクリングの過程で試薬が蒸発することを防ぎます． ***ノート：***サーマルサイクラーにトップヒーターがある場合，ミネラルオイルで重層する必要はありません．	―
⑦	試料をサーマルサイクラーに設置し，PCRを開始させます．サイクラーの温度プロファイルを以下のようにセットします．	50分間

	温　度	時　間	サイクル回数
最初の熱変性 （第1サイクルの前）	94℃	2分間	―
熱変性 **アニーリング** **伸長反応**	94℃ 60℃ 72℃	45秒間 45秒間 90秒間	30回

⑧	4 μlのPCR産物（約100～200 ng）を，操作2.3.2.2（ラベリング）に直接使用します．	―

2. 3. 2. 2 トランスクリプションによるRNAプローブのラベリング

ステップ	実験操作	時　間
①	滅菌済みRNaseフリーのマイクロ遠心チューブ（氷上に設置）に，以下の試薬を（リストされる順序に従って）加えます．	5分間

試　薬	容　量	最終濃度
再蒸留水，RNaseフリー	多様	
テンプレートDNA （操作2.3.2.1から）	多様	20 μl反応液当たり： ● 1 μgの直鎖化されたプラスミドDNA， または ● 100～200 ng（4 μl）のPCR産物
ラベリング混合液， 5×濃度［バイアル1a］	4 μl	1×濃度
トランスクリプションバッファー， 5×濃度［バイアル1b］	4 μl	1×濃度
RNAポリメラーゼ， 20 U/μl	2 μl	以下の2 U/μl： ● SP6 RNAポリメラーゼ［バイアル2］， または ● T7 RNAポリメラーゼ［バイアル3］， または ● T3 RNAポリメラーゼ［バイアル4］
全体の容量	**20 μl**	

1 バイアルの番号は，DIG Northern Starter Kit の内容物を示します．

ステップ	実験操作	時　間
②	チューブをおだやかにヴォルテックスし，チューブ内の溶液を均一にさせた後，手短に遠心してチューブの底に試料を集めます.	1 分間
③	チューブを42℃で1時間インキュベートします.	1 時間
④	[オプション] ● チューブに 2 μl のDNase I（RNaseフリー, バイアル 6）を加えます. ● 37℃で15分間インキュベートし，テンプレートDNAを除去します.	15分間
⑤	チューブに 2 μl の0.2 M EDTA（pH 8.0）を加え，よく混和させて反応を停止させます.	
⑥	● 反応混合液 0.5 μl を使用し，調製したプローブの量を概算します（以下の 2.3.2.3のトピックを参照）. ● 残りの反応混合液を，次に使用するまで−20℃にて保存します. ***ノート：***RNAの転写産物は，アガロースゲル電気泳動と臭化エチジウムにより解析することが可能です（しかし，2.3.2.3の代用とすることはできません）.	

2. 3. 2. 3 プローブの収量の決定

ハイブリダイゼーションを成功させるためには，至適量のプローブを使用することが欠かせません．ラベルされたプローブの定量は，至適なプローブ量を決定するための最初のステップです．したがって，ラベリング反応が完了したら，次はラベルされたプローブがどれくらいできたかの決定を行います．この決定は，プローブをハイブリダイゼーションに利用する前に行うことが必要です．

ラベルされたプローブの収量を概算する方法については，本章の75ページのセクション 2.5,「直接検出法によりプローブの収量を概算する」を参照ください．

2. 3. 2. 4 次に行うこと

何をしたいか		どうすればよいか，また，本書のどこを見ればよいか
RNAプローブを用いて得られた代表的な実験結果を見たい.	⇒	本章の72ページ，セクション 2.3.4を参照ください.
ラベルしたプローブを使用してノーザンまたはドットブロット上のRNAを検出したい.	⇒	本章の94ページ，セクション 3.2「RNAプローブのノーザンブロットへのハイブリダイゼーション」を参照ください.
ラベルしたプローブを使用して，細菌やファージのライブラリー中からリコンビナント・クローンを検出したい.	⇒	本章の126ページ，セクション 6.1「DIGラベルされたプローブをコロニー / プラークハイブリダイゼーションに使用」を参照ください.
ラベルしたプローブを後に使用するために保存したい.	⇒	ラベルしたプローブをエタノール中にて−20℃または−70℃で保存してください. ***ヒント：***ラベルされたプローブは−20℃または−70℃保存下で少なくとも 1 年間安定です.

2. 3. 3 トランスクリプションによるラベリングから最良の結果を得るために

2. 3. 3. 1 RNAプローブのラベリングにおける大切なヒント

要　素	ヒント
RNase	RNaseは至るところに存在し，活性に対していかなる補酵素も必要としません．ラベリングに成功するためには，RNaseのコンタミネーションを防ぐため可能な限りの注意を行ってください．例えば， ● 可能な限り使い捨てのプラスチック製器具や，乾熱滅菌させたガラス器具，あるいはRNase ZAPや同様の試薬によりコンタミネーション除去したプラスチック製器具を使用してください． ● ジエチルピロカーボネート（DEPC）またはジメチルジカーボネート（DMDC）処理された水を用いて全ての溶液を調製してください．また可能であれば，それらの溶液をオートクレーブしてください． ● 実験操作全般を通して，手袋を着用してください．
テンプレートの精製	● ラベリングの効率はDNAテンプレートの精製度に大きく依存します．テンプレートを高度に精製する必要があります． ● テンプレートは最終的に，直鎖化され，フェノール/クロロフォルム抽出後，エタノール沈殿されたものでなくてはなりません．
テンプレートのシークェンス	● プライマーやDNAテンプレート中のポリリンカー（マルチクローニング）サイトが，リボゾーマル28s-および18s-RNAシークェンスの一部とホモロガスを有する場合があります．したがって，ラベルされたプローブは特異的ですが，これらのRNAを顕著に含む試料中において不要なシグナルをもたらす可能性があります．この作用を最小限に抑えるため，テンプレートからポリリンカーのシークェンスをできる限り取り除いてください． ● DNAテンプレートを作成するためにPCRを使用する場合（2.3.2.1Bの操作），Expand High Fidelity反応の産物には3'末端のみオーバーハングのフラグメントが含まれる場合があります．このオーバーハングは，トランスクリプションによるラベリング反応において，ラップ-アラウンド（wrap-around）産物を生成する場合があります．
テンプレートの長さ	● 最適なテンプレートの長さは，約1 kbです． ● テンプレートの長さは，最低でも200 bp必要です．
プローブの保存	● 長期間安定に保存するためには，RNAプローブを分注し，−20℃または−70℃で保存してください． ● DIGラベルされたRNAプローブは，エタノール中にて−20℃または−70℃保存下で，少なくとも1年間安定です．
プローブの感度	● DIGラベルされたアンチセンスRNAプローブの感度を手短に決定するため，*in vitro* トランスクリプションによる相補的な（ラベルされていない）センスRNAを調製します．精製されたこのセンス転写産物をさまざまな濃度でノーザンブロットのターゲットとして使用します（本章のセクション3.2を参照）．ブロッティングの結果（73ページの図14を参照）から，ラベルされたプローブ（アンチセンス転写産物）により検出可能なターゲット（センス転写産物）の最小量を簡単に決定することが可能です．

2. 3. 3. 2 RNAラベリング法のトラブルシューティング

トラブルとなる問題	原因と考えられること	薦められる解決方法
プローブのラベリング効率が低い.	テンプレートが十分でない.	以下の量から操作を始めてください： ● 1μgの直鎖化したプラスミドDNA, または ● 100～200 ngのPCR産物
	テンプレートが分解している.	● テンプレートの抽出の際, ヌクレアーゼのコンタミネーションを防ぐための方法を厳密に守ってください.
	テンプレート調製液中にEDTAが含まれる.	● EDTAはラベリング反応を阻害します. テンプレートを0.1 mMよりも高濃度のEDTAを含む溶液中で保存しないでください.
	テンプレート調製液中にタンパクが含まれる.	● フェノール/クロロフォルム抽出およびエタノール沈殿により, テンプレートDNAからタンパク(特にRNase)を除去してください.
	プラスミドのテンプレートが直鎖化されていない.	● ラベリングの前に, 制限酵素を用いてプラスミド・テンプレートを直鎖化させてください.
化学発光検出において高いバックグラウンドを生じる(本章のセクション 4.1).	プローブのラベリングが効率よくできていない.	● 上記「プローブのラベリング効率が低い」の解説を参照ください.
	その他の理由.	● 本章の105ページ, セクション 3.3.2の「ハイブリダイゼーションブロットに関するトラブルシューティング」を参照ください.

2. 3. 4 DIGラベルされたRNAプローブを用いた代表的な実験結果

ノート：RNAプローブを用いた結果については，本章の113ページ，セクション 4.1.4にも紹介されています．参照ください．

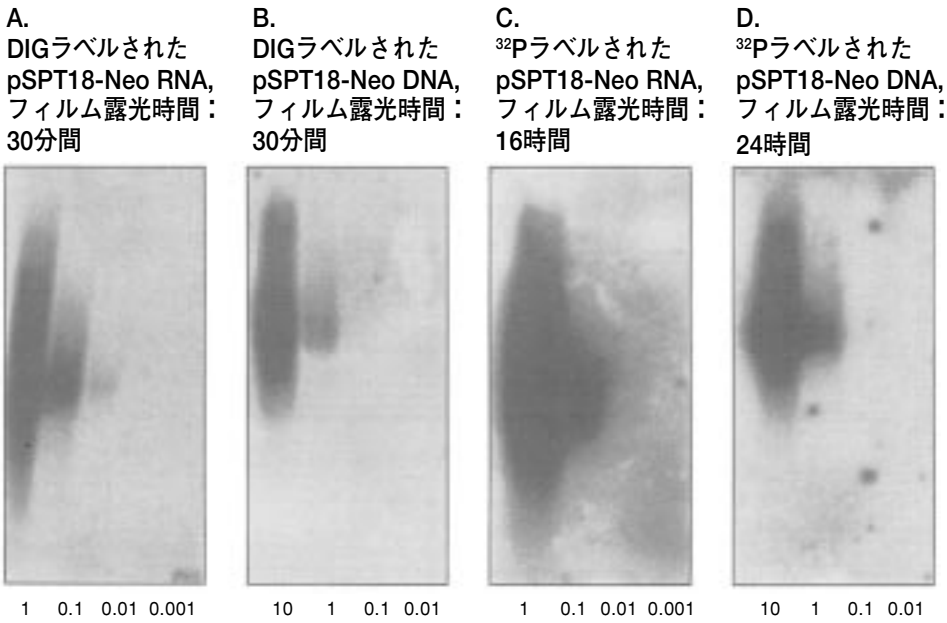


図13. ノーザンブロット上でのDNAプローブとRNAプローブとの感度の比較. このノーザンブロットのモデルでは，DIGラベルRNA（A），DIGラベルDNA（B），ラジオアクティブ・ラベルRNA（C），そしてラジオアクティブ・ラベルDNA（D）をそれぞれプローブとしてRNAターゲットを検出した際の感度の違いを示します．様々な量のポリ[A]+ *neo* RNA（センス鎖）を含むターゲットの試料を*in vitro*トランスクリプションした．各レーンの下に，サンプル中のRNA量（pg）を示します．ハイブリダイゼーションプローブには，*neo* RNAのアンチセンス鎖または相補的なcDNAが含まれた．ハイブリダイゼーションの操作は，使用するプローブのタイプに応じて至適化されました.ラジオアクティブなシグナルは,ブロットをX-線フィルムへ16時間（RNA）または24時間（DNA）露光して可視化させました.DIGのシグナルは，化学発光基質の添加後，ブロットをX-線フィルムへ30分間（RNAまたはDNA）露光して可視化させました．**結果および結論：**DIGラベルRNAプローブは，30分間の露光後，0.01 ngのターゲットRNAを検出することが可能でした．これに対して，ラジオアクティブ・ラベルRNAプローブでは，16時間の露光後で 0.1 ngが検出されただけでした．DIGラベルおよびラジオアクティブ・ラベルDNAプローブでは，1 ngのターゲットRNAを検出することが可能でした． したがって， RNAのターゲットを検出する場合，DIGラベルRNAプローブはDIGラベルDNAプローブの100倍高い感度を示します．しかも，DIGラベルプローブ（DNAまたはRNA）はそれぞれのラジオアクティブ・ラベルプローブよりも高い感度を示します（それぞれDNAプローブの検出感度は同等ですが，DIGのシグナルは30分間で可視化できたのに対し，ラジオアクティブのシグナルは24時間を必要としました.）．

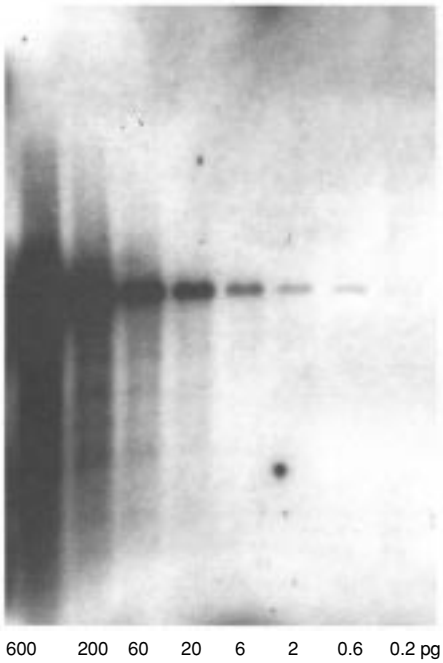


図14. ノーザンブロット上におけるDIGラベルされたプローブ感度の評価. 様々な量(600～0.2 pg)の，精製済みシングルコピー遺伝子由来のラベルされていないセンスRNA転写産物をMOPS-フォルムアルデヒドゲル分離し，ノーザンブロッティングによりナイロンメンブレンへトランスファーした．標準的なハイブリダイゼーション反応(本章のセクション3.2に解説される)により，DIGラベルされたハイブリダイゼーションプローブ(同じ遺伝子からの相補的アンチセンスRNA転写産物)の感度の決定を行った．
実験条件： DIG Easy Hyb 1 ml当たり100 ngのプローブを用いて65℃，オーバーナイトでハイブリダイゼーションを行った後，ストリンジェント洗浄を行った．ハイブリッドは，CSPD化学発光基質を用いて可視化された．この化学発光アッセイをX-線フィルムへ35分間露光させた(M. Block, University of Hamburg, Germanyの協力によるデータ)．
結論：ラベルされたプローブにより，0.2 pgのターゲットRNA(右端のレーン)の検出が可能である．

2. 4 オリゴヌクレオチドのDIGラベリング

in situ ハイブリダイゼーションなど，アプリケーションによってはDIGラベルされた合成オリゴヌクレオチドが最良のハイブリダイゼーションプローブとなる場合があります．*in situ* ハイブリダイゼーションの他にも，DIGラベルされたオリゴヌクレオチドを以下のアプリケーションに使用することが可能です：

- ハイブリダイゼーションプローブとして
  - ドットまたはスロットブロット
  - ライブラリーのスクリーニング
  - 遺伝子の反復シークェンスのサザンブロット上での検出

ノート：オリゴヌクレオチドプローブは，ブロット上に十分量のターゲットDNAが存在する場合(例えば，10 μgのヒトゲノムDNAなど)，複雑なゲノム中においてシングルコピー遺伝子を検出するのに十分な感度を有します．

- ノーザンブロット上に豊富に存在するmRNAの検出

オリゴヌクレオチドをDIGラベルするにはいくつかの方法があります.これらを次の表にまとめます.

ハイブリダイゼーション用プローブのDIGラベリングに関するテクニック

RNAまたはDNAにDIGを直接付加させる方法

オリゴヌクレオチドをDIGラベリングするための方法

実験方法[1, 2]（弊社の主要製品）	オリゴヌクレオチド[3]の必要量	ラベリングの温度と時間	ラベルされたプローブの検出感度	この方法の利点
DIG-ddUTPを用いた3'末端のラベリング（DIG Oligonucleotide 3' End Labeling Kit, 2nd generation Cat. No.3 353 575）	100 pmol	37℃, 15分間	10 pg DNA	● 必要となるテンプレートがほんの少量です. ●ラベルされたプローブは精製せずに使用可能です. ●反応を無制限にスケールアップすることが可能です（インキュベーション時間を 1 時間に延長した場合）.
DIG-dUTPとdATPのテールを3'末端に付加（約40～50残基）（DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd generation Cat. No.3 353 583）	100 pmol	37℃, 15分間	1 pg DNA	●必要となるテンプレートがほんの少量です. ●末端ラベルよりも感度の高いプローブを生成します. ●ラベルされたプローブは精製せずに使用可能です. ●反応を無制限にスケールアップすることが可能です.

1 これらオリゴヌクレオチドのラベリング法は全て，ライブラリーのスクリーニング，ドット/スロットブロット，*in situ* のアッセイに適したプローブを生成します.また, サザンブロット上のDNAシークェンスまたはノーザンブロット上の発現量の多いmRNAシークェンスの検出も使用することができます.

2 これらのラベリング反応の操作は，いずれもシンプルです．ラベリング反応の詳細については，適宜 Roche社製品の取扱説明書を参照ください（ウェブサイトからご覧頂けます．http://www.roche-applied-science.com）.

3 オリゴヌクレオチドの精製は重要です．オリゴヌクレオチドをラベリングする前に，必ずHPLCにより精製してください.

2. 5 直接検出法によりプローブの収量を概算する

ハイブリダイゼーションに正確な量のプローブを加えるには，ラベリング反応において生成されるDIGラベルされたプローブの量を決定することが最初に必要となります．ここで示す直接検出法は，プローブと既知の濃度のDIGラベルされたコントロール核酸とDIGラベルされたプローブとから調製した希釈系列について，比較を行う方法です．

ノート：DNAをPCRラベルする場合，直接検出法によりプローブの収量を評価する必要はありません．PCRラベルされたプローブについては，ゲル電気泳動による評価方法を使用してください（本章の57ページ，セクション 2.2.2.2）．

2. 5. 1 直接検出法に必要な材料

試薬 / 装置 / 設備	含まれる試薬や内容の説明
DIG Wash and Block Buffer Set（DNase- and RNase-フリー）（Cat. No. 1 585 762）	● 洗浄バッファー, 10 ×濃度 ● マレイン酸バッファー, 10 ×濃度 ブロッキング溶液の希釈用 ● ブロッキング溶液, 10 ×濃度 ● 検出バッファー, 10 ×濃度
核酸希釈用バッファー	● DNA Dilution Buffer：50 μg / ml 鰊精子DNAがTEバッファー（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 25℃にてpH 8.0）[1, 2] 中に懸濁される． ● RNA Dilution Buffer：DMDC-またはDEPC-処理された再蒸留水：20 ×SSC：フォルムアルデヒドの 5 : 3 : 2 混合比による混合液．
核酸コントロール	● DIGラベルコントロールDNA, 5 ng / μl（Cat. No. 1 585 738）[1] ● DIGラベルアクチンコントロールRNA, 10 ng / μl（Cat. No. 1 498 045）[3] ● DIG3' 末端ラベルコントロールオリゴヌクレオチド[2], 2.5 pmol / μl ● DIGテール付加コントロールオリゴヌクレオチド, 2.5 pmol / μl［DIG Oligonucleotide Tailing Kitのバイアル 7］
アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体	● Fabフラグメント（Cat. No. 1 093 274）[1, 3]
アルカリホスファターゼの化学発光基質	下記のいずれかを選択してください． ● Ready-to-useのCSPD（Cat. No. 1 755 633）[1] ● Ready-to-useのCDP-*Star*（Cat. No. 2 041 677）[3]
ナイロンメンブレン，ポジティブチャージ	● Cat. No. 1 209 272（20 ×30 cm） ● Cat. No. 1 209 299（10 ×15 cm） ● Cat. No. 1 417 240（0.3 ×3 mロール）
UVトランスイルミネーターまたはUVクロスリンカー	● 核酸をナイロンメンブレンに固定させるために使用します．

1 この試薬は，DIG-High Prime Labeling and Detection Starter Kit II にも含まれています．
2 この試薬は，DIG Oligonucleotide 3' End Labeling Kit, 2nd generationのバイアル 6 です．
3 この試薬は，DIG Northern Starter Kitにも含まれています．

2.5.2 操作方法

直接検出法の操作は，以下のフローチャートに示す操作に分けられます．それぞれの操作の所要時間も以下のチャートに示します．

2.5.2.1 （77ページ）	***ラベルプローブの希釈系列を作成し，ナイロンメンブレンへのスポット***	15分間
2.5.2.2 （80ページ）	***スポット中のDIGを化学発光により検出する***	2 ～ 2.5時間

ノート：このアイコンは，その操作の後にプロトコールを中断して，その産物を次の操作を開始するまで一時的に保存することが可能であることを示しています．

実験をはじめる前に： このアッセイに必要な溶液を確認してください．

ワーキング溶液	組成/調製方法	保存/安定性
マレイン酸バッファー[1]	0.1 Mマレイン酸, 0.15 M NaCl ; NaOH（固体）を用いてpH 7.5（20℃）に調整します．	室温で安定．
ブロッキング溶液[1]	10 × 濃度のブロッキング溶液を，マレイン酸バッファーを用いて1：10に希釈します．	使用時に新しく調製（4℃にて安定）．
洗浄バッファー[1]	0.1 Mマレイン酸, 0.15 M NaCl ; pH 7.5; 0.3%（v/v）Tween 20 ***ノート：***希釈を行う前にストック溶液を振とうし，バッファー組成をよく混ぜてください．	室温で安定．
抗体溶液[2], 75 mU/ ml	アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体（バイアル 5）を，もとのバイアルのまま10000 rpmで 5 分間遠心します．上清から少量をとり，ブロッキング溶液で1：10^4 に希釈します．	使用時に新しく調製（4℃にて12時間安定）．
検出バッファー[1]	0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5（20℃）	室温で安定．

1 これらのRNaseフリー, 10 × 濃度ストック溶液は, DIG Wash and Block Buffer Set（Cat. No. 1 585 762）の内容物として発売されています．特に指示がない限り, これらについては再蒸留水（RNAプローブについてはDMDC-またはDEPC-処理されたもの）にて10倍に希釈して使用してください．
2 抗体のストック（希釈されていない）試薬は，DIG-High Prime Starter Kit II および DIG Northern Starter Kit の内容物としても供給されています．

2. 5. 2. 1 ラベルされたプローブの希釈系列を作成し，メンブレンへスポットする

ステップ	実験操作			時　間
①	ラベルされたプローブの収量は，ラベリング時間とテンプレートの初期濃度に依存して概算されます.（予想される収量の情報については，適切なラベリング操作を参照ください.） **例：**			
	テンプレート	**ラベル法**	**予想されるプローブの収量**	
	高度に精製されたDNA 300 ng	DIG High Primeを用いたランダムプライムドラベリング（インキュベーション 1 時間）	450 ngのラベルされたDNA（最終濃度 = 450 ng / 22 μl = 20 ng / μl）	
	高度に精製されたプラスミド 1 μg	トランスクリプションによるラベリング（インキュベーション 1 時間）	20 μgのラベルされたRNA（最終濃度 = 20 μg / 24 μl = 800 ng / μl）	
	オリゴヌクレオチドの3'末端 100 pmol	3'末端ラベリング（インキュベーション15分間）	100 pmolの末端ラベルされたオリゴヌクレオチド（最終濃度 = 100 pmol / 22 μl = 4.5 pmol / μl）	
②	以下のいずれかのステップの操作を行ってください.			
	使用するプローブのタイプ	**操作ステップ**		
	DNAプローブ	ステップ 3A		
	RNAプローブ	ステップ 3B		
	オリゴヌクレオチドプローブ	ステップ 3C		

ステップ	実験操作	時　間
③ A	予想されるプローブの収量と反応混合液の最終容量に基づき，以下の方法でDNAプローブの希釈系列を調製してください． ● DNA Dilution Bufferを用いてラベルされたDNAプローブから1 ng / μlのワーキング溶液を調製します． ***溶液調製の例：***ステップ1の試料例（オリジナル濃度 = 20 ng / μl）のDNAプローブでは，これを1：20（1 μlのラベルされたプローブ + 19 μlのDNA Dilution Buffer）に希釈します． ● DIGラベルコントロールDNA（オリジナル濃度 = 5 ng / μl）をDNA Dilution Buffer中で1ng / μlのワーキング溶液に調製します． ● DNA Dilution Bufferを使用し，下表を参考にラベルされたプローブとコントロールプローブの，それぞれの希釈系列を調製します．	5 分間

チューブ番号	DNA（μl）	希釈するもとのチューブ番号	DNA Dilution Buffer（μl）	希釈率（チューブD1に対する）	最終濃度
D1*		—		なし	1 ng / μl
D2	2	D1	198	1：100	10 pg / μ l
D3	15	D2	35	1：330	3 pg / μ l
D4	5	D2	45	1：1000	1 pg / μl
D5	5	D3	45	1：3300	0.3 pg / μl
D6	5	D4	45	1：10^4	0.1 pg
D7	5	D5	45	1：33000	0.03 pg / μl
D8	5	D6	45	1：10^5	0.01 pg / μl
D9	0	—	50	—	0

*ラベルされたプローブまたはコントロールDNAの調製済み溶液

<table>
<tr><th>ステップ</th><th>実験操作</th><th>時　間</th></tr>
<tr><td>③ B</td><td>予想されるプローブの収量と反応混合液の最終容量に基づき，以下の方法でRNAプローブの希釈系列を調製してください.
●RNA Dilution Bufferを用いてラベルされたRNAプローブから10 ng / μl のワーキング溶液を調製します.
溶液調製の例：ステップ 1 の試料例（オリジナル濃度 = 800 ng / μl）のRNAプローブでは，これを 1：80（1 μl のラベルされたプローブ + 79 μl のRNA Dilution Buffer）に希釈します.
●DIGラベルアクチンコントロールRNA（10 ng / μl）をコントロールとして使用します.
●RNA Dilution Bufferを使用し，下表を参考にラベルされたプローブとコントロールプローブの，それぞれの希釈系列を調製します.
<table>
<tr><th>チューブ番号</th><th>RNA（μl）</th><th>希釈するもとのチューブ番号</th><th>RNA Dilution Buffer（μl）</th><th>希釈率（チューブR1に対する）</th><th>最終濃度</th></tr>
<tr><td>R1*</td><td></td><td>—</td><td></td><td>なし</td><td>10 ng / μl</td></tr>
<tr><td>R2</td><td>2</td><td>R1</td><td>18</td><td>1：10</td><td>1 ng / μl</td></tr>
<tr><td>R3</td><td>2</td><td>R2</td><td>198</td><td>1：1000</td><td>10 pg / μl</td></tr>
<tr><td>R4</td><td>15</td><td>R3</td><td>35</td><td>1：3300</td><td>3 pg / μl</td></tr>
<tr><td>R5</td><td>5</td><td>R3</td><td>45</td><td>1：10^4</td><td>1 pg / μl</td></tr>
<tr><td>R6</td><td>5</td><td>R4</td><td>45</td><td>1：3.3×10^4</td><td>0.3 pg / μl</td></tr>
<tr><td>R7</td><td>5</td><td>R5</td><td>45</td><td>1：10^5</td><td>0.1 pg / μl</td></tr>
<tr><td>R8</td><td>5</td><td>R6</td><td>45</td><td>1：3.3×10^5</td><td>0.03 pg / μl</td></tr>
<tr><td>R9</td><td>5</td><td>R7</td><td>45</td><td>1：10^6</td><td>0.01 pg / μl</td></tr>
<tr><td>R10</td><td>0</td><td>—</td><td>50</td><td>—</td><td>0</td></tr>
</table>
*ラベルされたプローブまたはコントロールRNAの調製済み溶液</td><td>5 分間</td></tr>
<tr><td>③ C</td><td>予想されるプローブの収量と反応混合液の最終容量に基づき，以下の方法でオリゴヌクレオチドプローブの希釈系列を調製してください.
● オリゴヌクレオチドプローブの100 fmol / μl ワーキング溶液を調製します.
溶液調製の例：ステップ 1 の試料例（オリジナル濃度 = 4.5 pmol / μl）のオリゴヌクレオチドプローブでは，これを 1：45（1 μl のラベルされたプローブ + 44 μl のDNA Dilution Buffer）に希釈します.
● DIGラベルコントロールオリゴヌクレオチド溶液（オリジナル濃度 = 2.5 pmol / μl）を 1：25に希釈して，コントロールとして使用します.
● DNA Dilution Bufferを使用し，下表を参考にラベルされたプローブとコントロールプローブの，それぞれの希釈系列を調製します.</td><td>5 分間</td></tr>
</table>

ステップ	実験操作						時　間
	チューブ番号	オリゴ(μl)	希釈するもとのチューブ番号	DNA Dilution Buffer(μl)	希釈率(チューブN1に対する)	最終濃度	
	N1*			―	なし	100 fmol / μl	
	N2	3	N1	7	1：3.3	30 fmol / μl	
	N3	2	N1	18	1：10	10 fmol / μl	
	N4	2	N2	18	1：33	3 fmol / μl	
	N5	2	N3	18	1：100	1 fmol / μl	
	N6	0	―	20	―	0	
	*ラベルされたプローブまたはコントロールオリゴヌクレオチドの調製済み溶液						
④	細く切ったポジティブチャージのナイロンメンブレン(約3×5 cm)上で，以下の操作を行います． ● プローブの希釈系列 D2～D9(ステップ 3A)，R3～R10(ステップ 3B)，または N2～N6(ステップ 3C)から1 μl ずつをメンブレン上にスポットします． ● メンブレン上にスポットしたプローブの希釈系列と並例させて，比較させるコントロールの希釈系列(D2～D9, R3～R10, N2～N6にそれぞれ対応するコントロールを適宜作成)から1 μlずつをスポットします． ● プローブとコントロールのスポットの位置に，鉛筆で印をつけます．						5分間
⑤	以下のいずれかの方法で，メンブレン上の核酸スポットを固定させます． ● Stratalinkerを用いて120 mJでクロスリンクさせます． ● UV光を用いて 3～ 5分間クロスリンクさせます． ● メンブレンを120℃で30分間ベークします． ● メンブレンを80℃で2時間ベークします．						3～5分間，または30分間，または2時間

2. 5. 2. 2 スポット中のDIGを化学発光により検出する

ノート：この操作を始める前に，必要となる全ての試薬をいつでも使用できるように調製しておきます．これは，操作中にメンブレンが乾燥することを防ぎ，またバックグラウンドの問題を最小限にするために有効です．特に指定がない場合，ステップは全て室温(15℃～25℃)で行ってください．

ステップ	実験操作	時　間
①	● 20 ml の洗浄バッファーの入ったプラスチック製容器(ペトリ皿など)に，(操作 2.5.2.1 からの)メンブレンを移します． ● 振とうしながら2分間インキュベートします． ● 洗浄バッファーを捨てます．	2分間
②	● 10 ml のブロッキング溶液中で，メンブレンを30分間インキュベートします． ● ブロッキング溶液を捨てます．	30分間
③	10 ml の抗体溶液中でメンブレンを30分間インキュベートします．	30分間
④	約10 ml の洗浄バッファーを用いて，メンブレンを15分間×2回洗浄します．	30分間

ステップ	実験操作	時　間
⑤	10 mlの検出バッファー中で，メンブレンを 2～ 5 分間平衡化させます.	2～5分間
⑥	● (DNAのブロット面を上にした)メンブレンをハイブリダイゼーションバッグ(または密着できるプラスチックバッグのような容器)の内側の面に置きます. ***ノート：***プラスチック製ラップは密封できないので，メンブレンをラップで**包まないでください.** ● 0.1 ml(およそ4滴)のready-to-useのCSPDまたはCDP-*Star* をメンブレン表面にかけます. ● **基質をかけたら直ちに，**メンブレンの表面にバッグのもう一方の面をかぶせて，基質がメンブレンの上に均一に広がるようにします. メンブレンとバッグとの間に気泡が入らないように注意します.	1分間
⑦	● メンブレンを 5 分間インキュベートします. ● 過剰な溶液をバッグからしごき出し，メンブレンぎりぎりのところでバッグの端をシールします.	5分間
⑧	以下のいずれかの操作を行います. ● CSPDを使用する場合,メンブレンを37℃で10分間インキュベートします. ● CDP-*Star* を使用する場合,このステップをとばしてステップ 9 へ進みます.	5～10分間
⑨	以下のいずれかの方法により．メンブレンをシールしたバッグごと露光させます. ● イメージャー(5～20分間) ● Lumi-Film X-線フィルム(15～25分間)	5～25分間
⑩	● コントロールの希釈系列のスポットを観察します．解析する目的の核酸タイプにより，以下のいずれかが見られるはずです. ●DNA用コントロールの5番目のスポット(チューブ D6, 0.1 pg/μl) ●RNA用コントロールの5番目のスポット(チューブ R7, 0.1 pg/μl) ●オリゴヌクレオチド用コントロールの4番目のスポット(チューブ N5, 1 fmol/μl) ●観察の結果により，以下のいずれかの操作を行ってください.	

観察の結果	次に行う操作
スポットが見える	ステップ 11 に進んでください.
スポットが見えない	ステップ 9 をもう一度行ってください. ただし, D6, R7 または N5 のコントロールのスポットが確認されるまで露光時間を長くしてください.

ステップ	実験操作		時　間
⑪	プローブの希釈系列のスポットの発光強度を観察しながら，以下を参考に結果を解析します.		1分間
	シグナルが確認できる最も希釈されたスポット	**ラベリング反応が成功しているかどうか**	
	［DNAの試料について］		
	5番目のDNAプローブスポット（チューブ D6）	**期待通りの**量のDNAがラベルされています. ***例：***操作 2.5.2.1 のステップ 3Aにおいて希釈されたDNA試料には，実際に20 ng / μlのラベルされたプローブが含まれています.	
	4番目のDNAプローブスポット（チューブ D5）	**まずまずの**量のDNAがラベルされています. ***例：***操作 2.5.2.1のステップ 3Aにおいて希釈されたDNA試料には,実際に約 7 ng / μlのラベルされたプローブが含まれています.	
	3番目のDNAプローブスポット（チューブ D4）	**十分な量のDNAがラベルされていません.** ***ノート：***DNAプローブの収量を確認したら,ステップ 12へ進んでください.	
	［RNAの試料について］		
	5番目のRNAプローブスポット（チューブ R7）	**期待通りの**量のRNAがラベルされています. ***例：***操作 2.5.2.1 のステップ 3Bにおいて希釈されたRNA試料には，実際に800 ng / μlのラベルされたプローブが含まれています.	
	4番目のRNAプローブスポット（チューブ R6）	**まずまずの**量のRNAがラベルされています. ***例：***操作 2.5.2.1のステップ3Bにおいて希釈されたRNA試料には，実際に約 270 ng / μlのラベルされたプローブが含まれています.	
	3番目のRNAプローブスポット（チューブ R5）	**十分な量のRNAがラベルされていません.** ***ノート：***RNAプローブの収量を確認したら,ステップ 12へ進んでください.	
	［オリゴヌクレオチドの試料について］		
	4番目のオリゴプローブスポット（チューブ N5）	**期待通りの**量のオリゴヌクレオチドがラベルされています. ***例：***操作 2.5.2.1 のステップ 3Cにおいて希釈されたオリゴヌクレオチド試料には, 実際に 4.5 pmol / μlのラベルされたプローブが含まれています.	
	3番目のオリゴプローブスポット（チューブ N4）	**まずまずの**量のオリゴヌクレオチドがラベルされています. ***例：***操作 2.5.2.1 のステップ 3Cにおいて希釈されたオリゴヌクレオチド試料には, 実際に約 1.5 pmol / μlのラベルされたプローブが含まれています.	
	2番目のオリゴプローブスポット（チューブ N3）	**十分な量のオリゴヌクレオチドがラベルされていません.** ***ノート：***オリゴヌクレオチドプローブの収量を確認したら，ステップ 12へ進んでください.	

ステップ	実験操作		時　間
⑫	ステップ11の結果に基づき，以下のいずれかの操作を行ってください．		—
	ステップ11の結果	**次に行う操作**	
	期待通りの量のラベルされたプローブが得られた（ステップ11において，チューブD6, R7, またはN5のスポットが見られた）．	算出されたプローブの濃度に従い，ハイブリダイゼーションに加えるプローブ溶液の量を決定します． ***例：*** 操作2.5.2.1のステップ3Aに用いたDNA試料でサザンブロット上のDNAを検出する場合，ハイブリダイゼーション溶液1 ml当たり20 ng/μlのDNAプローブ溶液1.25 μl（25 ngのDNAプローブ）を使用します．	
	まずまずの量のラベルされたプローブが得られた（ステップ11において，チューブD5, R6, またはN4のスポットが見られた）．	算出されたプローブの濃度に従い，ハイブリダイゼーションに加えるプローブ溶液の量を決定します． ***例：***操作2.5.2.1のステップ3Aに用いたDNA試料でサザンブロット上のDNAを検出する場合，ハイブリダイゼーション溶液1 ml当たり7 ng/μlのDNAプローブ溶液3.75 μl（25 ngのDNAプローブ）を使用します．	
	ラベルされたプローブの量が十分に得られなかった（ステップ11において，チューブD5, R6, またはN4のスポットが見られなかった）．	ラベルされたプローブを捨てて，新しいプローブを作成してください．	

3. DIGラベルされたプローブをブロットへハイブリダイズさせるテクニック

このセクションのテクニックを利用して，セクション2でラベルしたプローブの1つを用い，ブロット上でターゲット核酸の局在を検出しましょう．このセクションで解説される方法は，以下の通りです．

トピックの情報		セクション	ページ
DNAプローブのサザンブロットへのハイブリダイゼーション	⇒	3.1	84
RNAプローブのノーザンブロットへのハイブリダイゼーション	⇒	3.2	94
ブロットから最良の結果を得るために	⇒	3.3	103

3. 1 DNAプローブのサザンブロットへのハイブリダイゼーション

DIGラベルされたプローブは，サザンブロットやドットブロット上のDNA試料の検出に極めて適しています．このセクションでは，電気泳動によるジェノミックDNAの分離，DNAのナイロンメンブレンへのトランスファー(サザンブロット)，DIGラベルされたプローブを使用したブロット上のシングルコピー遺伝子の検出の方法について解説します．この操作に使用するハイブリダイゼーションプローブは，ランダムプライムドラベリング(本章の43ページ，セクション2.1)またはPCRラベリング(本章の51ページ，セクション2.2)のいずれかの方法で調製することが可能です．

ノート：DNAが豊富なターゲットの検出にはオリゴヌクレオチドプローブを使用することも可能です．詳しい情報については，セクション 3.1.3 (93ページ)の「DIGラベルされたオリゴヌクレオチドプローブを用いてサザンブロット上にあるターゲットDNAを検出するための方法」を参照ください．このセクションの内容は以下の通りです．

トピックの情報		ページ
電気泳動，ブロッティング，ハイブリダイゼーションに必要な材料	⇒	85
操作方法：		
● アガロースゲルでDNA試料を分離する	⇒	87
● DNAをメンブレンへトランスファーする(サザンブロット，キャピラリートランスファー法)	⇒	87
● DIG Easy Hybを用いたブロットのプレハイブリダイゼーション	⇒	89
● DIGラベルされたDNAプローブとブロット上のDNAとをハイブリダイズさせる	⇒	90
● 次に行うこと	⇒	93
DIGラベルされたオリゴヌクレオチドプローブを用いてサザンブロット上にあるターゲットDNAを検出するための方法	⇒	93

3. 1. 1 電気泳動，ブロッティング，ハイブリダイゼーションに必要な材料

下記の操作のために，次の試薬や設備が必要になります．

設　備 / 試　薬	説明および目的
電気泳動に必要とされるもの	
核酸用グレードのアガロース	● 適切なアガロース製品については，193ページの付録，ご注文情報を参照ください．
泳動バッファー	● 89 mM Tris borate, 2 mM EDTA, pH 8.3（TBE）（またはその他の適切なバッファー）
DIGラベルされたDNA分子量マーカー	● ブロット上のターゲットDNAの分子量を簡易的に決定するため使用します．発売されているDIGラベルされた分子量マーカー製品については，190ページのご注文情報または弊社ウェブサイト（http:/www.roche-applied-science.com）を参照ください．
サザンブロットに必要とされるもの	
ラベルされたDNAプローブ	● ランダムプライムドラベリング（本章の43ページ，セクション 2.1），またはPCRラベリング（本章の51ページ，セクション 2.2）により調製されたもの．
ナイロンメンブレン，ポジティブチャージ	● Cat. No. 1 209 272（20 × 30 cm） ● Cat. No. 1 209 299（10 × 15 cm） ● Cat. No. 1 417 240（0.3 × 3 mロール）
UVトランスイルミネーターまたはUVクロスリンカーまたは　オーブン	● DNAをナイロンメンブレンに固定させるために使用します．
ウォーターバス	● プレハイブリダイゼーション溶液やハイブリダイゼーション溶液をあらかじめ温めるために使用します．
振とう式ウォーターバス	● プレハイブリダイゼーションやハイブリダイゼーションのインキュベーションおよび，ストリンジェント洗浄に使用します．
滅菌済み再蒸留水	● ゲルの洗いやDNAの希釈に使用します．
脱プリン化溶液	● 250 mM HCl
変性溶液	● 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
中和溶液	● 0.5 M Tris-HCl（pH 7.5），1.5 M NaCl
20 × SSCバッファー	● 3 M NaCl, 300 mM sodium citrate, pH 7.0（Cat. No. 1 666 681）
10 × SSC	● 1.5 M NaCl, 150 mM sodium citrate, pH 7.0
2 × SSC	● 0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate, pH 7.0
Whatman 3 MM紙	● キャピラリートランスファーに使用します．

設　備 / 試　薬	説明および目的
プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションに必要とされるもの	
ハイブリダイゼーション バッファー	● DIG Easy Hyb（Cat. No. 1 603 558）または ● DIG Easy Hyb顆粒（Cat. No. 1 796 895）[1]
ハイブリダイゼーション バッグ	● Cat. No. 1 666 649（50バッグ；25 × 24 cm）
低ストリンジェンシー バッファー	● 0.1% SDS, 2 × SSC
高ストリンジェンシー バッファー	● 0.1% SDS, 0.5 × SSC

1 この試薬は, DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II（Cat. No.1 585 614）にも含まれています.

3. 1. 2 操作方法

サザンブロットのプロトコールは, 以下のフローチャートに示す操作に分けられます. それぞれの操作の所要時間も以下のチャートに示します.

3.1.2.1 （87ページ）	***アガロースゲルでDNA試料を分離する***	30分間～ 2 時間
3.1.2.2 （87ページ）	***DNAをメンブレンへトランスファーする（サザンブロット）*** ステージ A：DNAの脱プリン化および変性 ステージ B：DNAのナイロンメンブレンへのキャピラリートランスファー ステージ C：UV またはベーキングによるDNAのメンブレンへの固定	1時間 オーバーナイト 3 分間～ 2 時間
3.1.2.3 （89ページ）	***DIG Easy Hybを用いたブロットのプレハイブリダイゼーション***	30分間
3.1.2.4 （90ページ）	***DIGラベルDNAプローブとブロット上のDNAとをハイブリダイズさせる*** ステージ A：ラベルされたプローブ[1] とブロッティングメンブレンをインキュベート ステージ B：メンブレンを洗浄し, ハイブリダイズしなかったプローブを除去	4 ～16時間 45分間

1 このステージの操作は, ブロット上のDNAを検出するためのDIGラベルされたDNAプローブの使用について解説したものです. しかし, 操作 3.1.2.1～3.1.2.4を必要に応じて改めることにより, DIGラベルされたオリゴヌクレオチドプローブを使用してDNAターゲットを検出することも可能です. 93ページの「DIGラベルされたオリゴヌクレオチドプローブを用いてサザンブロット上にあるターゲットDNAを検出するための方法」を参照ください.

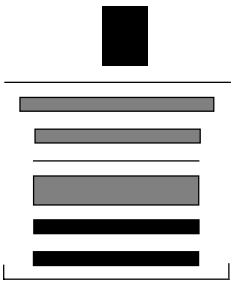
ノート: このアイコンは, その操作の後にプロトコールを中断して, その産物を次の操作を開始するまで一時的に保存することが可能であることを示しています.

3. 1. 2. 1 アガロースゲルでDNA試料を分離する

ステップ	実験操作	時　間
①	TBEなどのバッファー中に適切な電気泳動用ゲルを用意します． できるだけ薄いゲルを作成します． ***ノート：***最適な結果を得るためには，ゲル中や泳動バッファー中に臭化エチジウムを加えないでください．ゲルが長時間泳動されていない場合，エチジウムが不均一なバックグラウンドを生じることがあります．	
②	少量のターゲットDNAの試料（適切なDNA用ローディングバッファーに混和させた後）をゲルにロードします．通常，ターゲットDNAの濃度を低く抑えてください．薦められる濃度について，以下に例示します． ● 1レーン当たり2.5～ 5 μgのヒトジェノミックＤＮＡ ● ゲノムがヒトDNAよりも複雑な場合（植物DNAなど），1レーン当たり最大10 μgのジェノミックDNA ● 1レーン当たり < 1 ng のプラスミドDNA	
③	分子量マーカーとして，DIGラベルされたDNA分子量マーカー（DNA用ローディングバッファーに混和させたもの）を約5 μlロードします． ***ノート：***必要となる量は，予想されるハイブリダイゼーション産物のサイズに依存します．試料のハイブリッドのサイズと同等のバンドが明瞭に現れるよう，十分な量のマーカーをロードしてください．	
④	DNAのバンドがしっかりと分離されるまでゲルの泳動を行います．	30分間～2 時間
⑤	ターゲットDNAの質を評価するため，ゲルを0.25～0.50 μg / mlの臭化エチジウムで染色し，ゲルをUV光下で調べます．	15～30分間

3. 1. 2. 2 DNAをメンブレンへトランスファーする（サザンブロット，キャピラリートランスファー法）

ステップ	実験操作	時　間
①	以下のいずれかの操作に進みます： ● ハイブリダイゼーションのターゲットが 5 kb以下の場合，ステップ 3へ進みます． ● ハイブリダイゼーションのターゲットが 5 kbを上回る場合，ステップ 2へ進みます	
②	トランスファーの前に以下の方法でDNAを脱プリン化させます． ● ゲルを250 mM HCl中に浸漬し，ブロモフェノールブルーのマーカーの色が青から黄色に変わるまで室温で振とうします． ***ノート：***ヒトDNAを処理する場合，10分以上操作を続けないでください．また，植物DNAを処理する場合，20分以上操作を続けないでください． ● 滅菌済み再蒸留水でゲルを洗います． ***ノート：***脱プリン化は，ターゲットDNAが5kbを上回る場合にのみ必要な操作です．	10～20分間
③	以下の操作で，ゲル中のDNAを変性させます． ● ゲルを変性溶液（0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl）中に15分間×２回浸漬させます．この操作は室温で軽く振とうしながら行います． ● 滅菌済み再蒸留水でゲルを洗います．	30分間
④	ゲルを中和溶液（0.5 M Tris-HCl, pH 7.5; 1.5 M NaCl）中に15分間×２回，室温で浸漬させます．	30分間
⑤	ゲルを20 ×SSC中に10分間以上置き，平衡化させます．	10分間

<table>
<tr><th>ステップ</th><th>実験操作</th><th>時　間</th></tr>
<tr><td>⑥</td><td>以下の方法でブロットトランスファーのセットアップを行います．
気泡が入ることを防ぎながら操作を行ってください．
● Whatman 3 MM紙1枚を20×SSCに浸し，20×SSCを入れた浅めの容器の中に置いた「ブリッジ」の上に乗せます．
● 20×SSCをしみこませたこのWhatman 3 MM紙の上にゲルを乗せます．滅菌済みのピペットをゲルの上で転がし，ゲルと紙との間に生じた気泡を取り除きます．
● ポジティブチャージのナイロンメンブレンをゲルの大きさに切ります．
● 乾いた状態のメンブレンを，ゲル泳動面の上に乗せます．
上記と同様に，ピペットを使って気泡を取り除きます．
● 乾いたWhatman 3 MM紙1枚，さらに厚く重ねたペーパータオルを乗せ，その上にガラス板を置いて200～500 gの重りを乗せます．
ブロットトランスファーの最終的な「サンドイッチ」の順序は，下の図の通りです．
 
</td><td>15分間</td></tr>
<tr><td>⑦</td><td>トランスファーバッファー（20×SSC）中にてオーバーナイトでブロットトランスファーを行います．</td><td>オーバーナイト</td></tr>
<tr><td>⑧</td><td>ブロットが湿っている間に，以下のいずれかの方法でDNAを固定させます．
<table>
<tr><th>固定に使用する設備</th><th>固定のための操作方法</th></tr>
<tr><td>UVクロスリンク</td><td>● （DNAのブロット面を上にした）メンブレンを，2×SSCに浸漬したWhatman 3 MM紙に乗せます．
● メンブレンを湿ったままUV光に当てます．標準的なプロトコールでは，トランスイルミネーターで1～3分間照射します[1]．
● 滅菌再蒸留水でメンブレンを手短に洗います．
● メンブレンを風乾させます．</td></tr>
<tr><td>ベーキング</td><td>● メンブレンを2×SSCで手短に洗います[2]．
● 以下のいずれかの方法でメンブレンをベークします．
● 120℃にて30分間，または
● 80℃にて2時間</td></tr>
</table>
1 弊社ではDNAの架橋固定にはUV Stratalinkerを使用しています（120 mJにて）．UVトランスイルミネーターを使用することも可能ですが，経験的にUVの照射時間を決定する必要があります．一般的に短波長のUVでは1分間以内の照射でクロスリンクさせることが可能です．長波長のUVでは2～3分間照射を行ってください．トランスイルミネーターによっては，5分間の照射を必要とするものがあります．
2 ベーキングの際に20×SSC（トランスファーバッファー）がメンブレン上にベークされないよう注意します．乾燥による塩結晶は，化学発光検出アッセイの際に「星状」のシグナルを生じます．</td><td>3分間～2時間</td></tr>
</table>

ステップ	実験操作		時　間
⑨	以下のいずれかの操作に進んでください.		
	何をしたいか	**どうすればよいか，また，本書のどこを見ればよいか**	
	操作を続けたい	メンブレンを操作 3.1.2.3にそのまま使用します.	
	操作をここで中断し，次回使用するまでブロットを保存したい.	乾燥させたブロットをWhatman 3 MM紙ではさみ，シールできるバッグに入れて 4℃で保存します.	

3. 1. 2. 3 DIG Easy Hybを用いたブロットのプレハイブリダイゼーション

ノート：

- 操作 3.1.2.3 および 3.1.2.4 を利用してドットブロット上のDNAの検出を行うことが可能です.
- プレハイブリダイゼーション，ハイブリダイゼーションおよび検出(本章のセクション 4) の過程で，メンブレンを絶対に乾燥させないでください. メンブレンが乾燥したり，(ブロットを複数同時に処理している場合など) メンブレンどうしがくっついたりすると，高いバックグラウンドを生じます.

例外：高ストリンジェント洗浄の後では，メンブレンを風乾させ，次回解析に使用するまで4℃で保存することが可能です. ただし，保存されたメンブレンからプローブを剥離したりリプロービングしたりすることはできません.

ステップ	実験操作	時　間
①	プローブ，ターゲット，ハイブリダイゼーションバッファーの特性に応じて，最適なハイブリダイゼーション温度(T_{hyb})を決定します. 159ページの付録Aに記載される計算式を使用して，T_{hyb}を計算してください. **例：**ターゲットが40%のGCシークェンスを持つ哺乳類DNAで，DIG Easy Hybを使用する場合，最適なハイブリダイゼーション温度(T_{hyb})は，42℃です. ***ノート：***T_{hyb}はターゲットと80%～100%のホモロガスを有するプローブに対する，厳密なハイブリダイゼーション温度です. プローブとターゲットとのホモロジーが80%に満たない場合，T_{hyb}を低くする必要があります(ミスマッチ１% ごとにT_{hyb}から1.4℃ずつ低くするなど).	2 ～ 3 分間
②	● 下記のそれぞれの操作にどのくらいの量のDIG Easy Hybが必要であるかを決定します. メンブレン100 cm^2 (10 cm × 10 cmなど)ごとに以下の量が必要になります： ● プレハイブリダイゼーションのステップでは，10 mlのDIG Easy Hybが必要です. ● ハイブリダイゼーションのステップでは，3.5 mlのDIG Easy Hybが必要です. ● 滅菌済みのプラスチック製チューブに正確な量のDIG Easy Hybを入れ，チューブを適切なハイブリダイゼーション温度に設定されたウォーターバスに設置します(上記ステップ１参照).	2 ～ 3 分間
③	ブロットをハイブリダイゼーションバッグ(Cat. No. 1 666 649)内に置きます. ***ノート：***プレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションのステップは，耐熱性プラスチックバッグ，ガラス製ボックス，ペトリ皿，ローラーボトルやシール式プラスチックバッグなど，密封できるものであればどのような容器でもほぼ代用することが可能です. 容器はハイブリダイゼーションバッファーからNH_4が放出されインキュベーションのpHが変化しないよう，操作中の密閉性が必要です.	2 ～ 3 分間

ステップ	実験操作	時　間
④	ブロットの周囲ぎりぎりのところでバッグを熱シールしてバッグの面積を最小にし, プレハイブリダイゼーションやハイブリダイゼーション溶液，そして必要となるプローブの量が最少となるようにします.	2 ～ 3 分間
⑤	● あらかじめ温めておいたDIG Easy Hybを適量（100 cm²当たり10 ml）バッグに入れます. *Tip：*十分な量のバッファーをバッグに入れると，シールした後のバッグはやや膨らんで見えます. ● 弊社のハイブリダイゼーションバッグを使用する場合, 蛇口の部分を取り除き（切り取る）, 気泡を取り除きながらバッグのブロットの周囲をシールしてください.	2 ～ 3 分間
⑥	● ハイブリダイゼーションバッグを循環式ウォーターバスの底に水平に設置します. ● バッグの隅の上に重りを置き，固定します（重りはブロットに触れないこと）. ● ブロットを適切なハイブリダイゼーション温度（ステップ 1 を参照）で少なくとも30分間インキュベートします. プレハイブリダイゼーションのステップの間, メンブレンがおだやかに振とうとするよう, 重りの位置を調節します.	30分間
⑦	以下のいずれかの操作に進んでください：	―

何をしたいか	**どうすればよいか，また，本書のどこを見ればよいか**
操作を続けたい	メンブレンを操作 3.1.2.4にそのまま使用します.
操作を続ける前に, しばらく時間を置きたい	メンブレンをDIG Easy Hyb 中で振とうしたまま，数時間放置します. このステップは結果に影響しません.

3.1.2.4 DIGラベルされたDNAプローブとブロット上のDNAとをハイブリダイズさせる

ステップ	実験操作	時　間
①	ラベルされたプローブの概算量（セクション 2.2.2.2 または セクション 2.5.2.2 で決定したもの）から，ハイブリダイゼーションに必要なDIGラベルされたプローブの量を決定します. *Tip：*ヒトジェノミックDNAにおけるシングルコピー遺伝子を検出する場合, ハイブリダイゼーションバッファー 1 ml 当たり, 少なくとも25 ng のランダムプライムドラベルされたプローブ, 2 μl の PCRラベルされたプローブを使用することを薦めます.	1 分間
②	以下の方法でハイブリダイゼーション溶液を調製します： ● ラベリング反応産物が入ったチューブから, 適切な量のラベルされたプローブを取り出します. ● ラベルされたプローブを50 μl の水とともにマイクロ遠心チューブに入れます. ● マイクロ遠心チューブを沸騰中のウォーターバスに5分間設置し，プローブを変性させます. ● 氷上でプローブを急冷します. ● あらかじめ温めておいたDIG Easy Hybが適量（100 cm² 当たり3.5 ml）入ったチューブに，変性させたプローブを速やかに加え，チューブを倒置転倒させて混和させハイブリダイゼーション溶液を作成します.	10 分間

ステップ	実験操作	時　間
③	以下の方法でブロットにハイブリダイゼーション溶液を加えます： ● シールされたハイブリダイゼーションバッグを切り開けて，プレハイブリダイゼーションバッファーを流し出します． ● **直ちに**，DIGラベルされたプローブを含むハイブリダイゼーション溶液をバッグに加えます． ● 気泡を除きながら，バッグの周囲をシールします．	2 ～ 3 分間
④	● ハイブリダイゼーションバッグを振とう式ウォーターバスの底に水平に設置します． ● バッグの隅の上に重りを置き，固定します（重りはブロットに触れないこと）． ● ブロットを適切なハイブリダイゼーション温度（操作 3.1.2.3 のステップ 1 を参照）で 6 ～16時間インキュベートします． インキュベーションの間，メンブレンがおだやかに振とうするよう，重りの位置を調節します． ***Tip：***オーバーナイトのハイブリダイゼーションを薦めますが，高感度を必要としない場合には，インキュベーションを短くすることができます．ハイブリダイゼーションの大部分は 6 時間後に完了します．	6 ～16 時間
⑤	● プラスチック製トレーに 200 ml の低ストリンジェンシーバッファー（0.1% SDS，2 × SSC）を入れます． ***ノート：***このステップから先，バッファーの量は使用する容器の大きさによります．それぞれのステップで，メンブレンが完全に溶液に覆われていることを確認してください． ● ハイブリダイゼーションのインキュベーションが終了したら，バッグを切り開けてハイブリダイゼーション溶液を流し出します． ***Tip：***このハイブリダイゼーション溶液をチューブに集めて−20℃で保存し，将来再利用することが可能です．3 ～ 5 回の再利用が可能です． ● **直ちに**，メンブレンを低ストリンジェンシーバッファーの入ったプラスチック製トレーの中に入れます．	2 分間
⑥	● トレーを室温で 5 分間，振とうしながらインキュベートします． ● 使用済みのバッファーを捨て，直ちに 200 ml の新しい低ストリンジェンシーバッファーを加えます． ● トレーをさらに室温で 5 分間，振とうしながらインキュベートします．	10分間

<table>
<tr><th>ステップ</th><th colspan="4">実験操作</th><th>時　間</th></tr>
<tr><td>⑦</td><td colspan="4">ステップ 6 の間に，高ストリンジェンシーバッファーを振とう式ウォーターバスで適切な温度に温めておきます．
Tip：適切な高ストリンジェンシーバッファーや洗浄の温度は，プローブとターゲットに依存します．例えば，ヒトや他の哺乳類DNAを検出する場合については，以下のガイドラインに従ってください：
使用するプローブの特性 ／ 高ストリンジェンシー洗浄の条件
ターゲットとのホモロジー ／ GC含有率 ／ バッファー ／ 温　度
80〜100% ／ 平均的（40%） ／ 0.5×SSC + 0.1%SDS ／ ●プローブが 100 bpより大きい場合，65℃ ●プローブが短い（100 bp 以下）場合，65℃未満[1]
80%未満 ／ 平均的（40%） ／ 0.5×SSC + 0.1%SDS ／ およそ60℃[1]
80〜100% ／ 高い（50%） ／ 0.1×SSC + 0.1% SDS ／ 68℃
1 正確な温度は，経験的に決定してください．</td><td>5 分間</td></tr>
<tr><td>⑧</td><td colspan="4">● 低ストリンジェンシーバッファーを捨てます．
● 直ちに，あらかじめ温めておいた高ストリンジェンシーバッファーをブロットが入った容器に加えます．
● あらかじめ温めておいた高ストリンジェンシーバッファーを用い，適切な洗浄温度（ステップ 7で決定した温度）でブロットを15分間×2回洗浄します．洗浄の間，ブロットをおだやかに振とうさせてください．</td><td>30分間</td></tr>
</table>

3. 1. 2. 5 次に行うこと

何をしたいか		どうすればよいか，また，本書のどこを見ればよいか
ハイブリダイゼーションの結果を見たい	⇒	本章の106ページ，セクション 4 の「ブロット上にハイブリダイズしたプローブを検出するテクニック」を参照ください．
次回使用するまでブロットを保存したい	⇒	メンブレンを風乾させ，バッグに入れて4℃で保存します． ***ノート：***乾燥させて保存したメンブレンは，検出アッセイ後にプローブの剥離やリプロービングには使用できません．
DNAハイブリダイゼーションのプロトコールを最適化させる方法を学びたい	⇒	本章の103ページ，セクション3.3の「ブロットから最良の結果を得るために」を参照ください．
DIGラベルされたDNAプローブを用いて得られた代表的な実験例を見たい	⇒	本章の113ページ，セクション 4.1.4 の「化学発光検出アッセイを用いた代表的な実験結果」を参照ください． 本章の121ページ，セクション 4.2.3 の「発色検出アッセイを用いた代表的な実験結果」を参照ください．

3. 1. 3 DIGラベルされたオリゴヌクレオチドプローブを用いてサザンブロット上にあるターゲットDNAを検出するための方法

サザンブロット上のDNAを検出するために，DIGラベルされたDNAプローブの代わりにDIGラベルされたオリゴヌクレオチドを使用する場合，操作 3.1.2.1 ～ 3.1.2.4 を以下の方法で変更してください：

DNAプローブの代わりにオリゴヌクレオチドを使用する場合に変更するパラメーター	変更の仕方	変更されるステップ
ゲルに泳動させるDNA量	ゲル当たりのDNA量を増やします： ● ヒトジェノミックDNAは10 μg ● プラスミドDNAは 2 ng	● 操作 3.1.2.1，ステップ 2
プレハイブリダイゼーション，ハイブリダイゼーションおよび高ストリンジェンシー洗浄の温度	● 温度を以下のように下げてください． （オリゴヌクレオチドのT_m）－10℃（ノート 1 を参照）．	● 操作 3.1.2.3，ステップ1, 2 および 6 ● 操作 3.1.2.4，ステップ 4, 7 および 8
ハイブリダイゼーション中に使用するラベルされたプローブの量	プローブの濃度を以下のように変更してください（ハイブリダイゼーションバッファー 1 ml 当たり）： ● 1～10 pmol の 3'末端ラベルされたオリゴヌクレオチド，または ● 0.1～10 pmolのテール付加されたオリゴヌクレオチド（ノート2参照）	● 操作 3.1.2.4，ステップ 1
ハイブリダイゼーション時間	● インキュベーション時間を 1～ 6 時間に縮めてください．	● 操作 3.1.2.4，ステップ 4

1 オリゴヌクレオチドのT_m＝[（G＋C基の数）×4℃]＋[（A＋T基の数）×2℃]
2 テール付加されたオリゴヌクレオチドを使用する場合，テールとメンブレンとの非特異的な結合を防ぐため，ハイブリダイゼーションバッファー中に 0.1 mg / ml のポリ[A]と 5 μg / ml のポリ[dA]を加えます．

3. 2 RNAプローブのノーザンブロットへのハイブリダイゼーション

DIGラベルされたRNAプローブは，ノーザンブロット上でRNAを検出するのに理想的です. RNAプローブはDNAプローブに比べ，小量のターゲットRNAを検出する際に高い感度を示します.

ノート：ブロットされた試料にRNAが多量に含まれている場合は，ターゲットRNAの検出にDNAプローブを使用することも可能です．さらに詳しい情報については，セクション 3.2.3 (102ページ)の「DIGラベルされたDNAプローブを用いてノーザンブロット上にあるターゲットRNAを検出するための方法」を参照ください.

このセクションでは，RNAの電気泳動による分離，ナイロンメンブレンへのRNAのトランスファー(ノーザンブロット)，DIGラベルされたRNAプローブの使用によるブロット上の特定のmRNAの検出の方法について解説しています．この操作に用いるハイブリダイゼーション用RNAプローブは，トランスクリプションによるラベリング操作により調製することが可能です(本章の62ページ，セクション 2.3 を参照)．このセクションのトピックは以下の通りです.

トピックの情報		ページ
電気泳動，ブロッティング，ハイブリダイゼーションに必要な材料	⇒	95
操作方法：		
● アガロースゲルでRNA試料を分離する	⇒	97
● RNAをメンブレンへトランスファーする(ノーザンブロット，キャピラリートランスファー法)	⇒	98
● DIG Easy Hybを用いたブロットのプレハイブリダイゼーション	⇒	99
● DIGラベルされたRNAプローブとブロット上のRNAとをハイブリダイズさせる	⇒	101
● 次に行うこと	⇒	102
DIGラベルされたDNAプローブを用いてノーザンブロット上にあるターゲットRNAを検出するための方法	⇒	102

3. 2. 1電気泳動，ブロッティング，ハイブリダイゼーションに必要な材料

下記の操作のために，次の試薬や設備が必要になります：

設　備 / 試　薬	説明および目的
操作全般に必要とされるもの	
オートクレーブ済み，DMDC-またはDEPC-処理水	● 操作に必要な全ての試薬の調製に使用します.
オーブン，200℃	● ガラス器具を乾熱滅菌し，RNaseを不活性化させます.
RNase ZAP	● 実験台など実験環境のコンタミネーションを除去します.
パウダーフリーの手袋，滅菌済みのピンセット	● 実験器具やメンブレンをRNaseフリーの状態で取り扱うために使用します.
20 × SSC	● 3 M NaCl ; 300 mM sodium citrate, pH 7.0 （Cat. No. 1 666 681） （洗浄バッファーやトランスファーバッファーの調製に使用）
RNAの電気泳動のために必要なもの	
核酸グレードのアガロース	● 適切なアガロース製品については，192ページの付録，ご注文情報を参照ください.
MOPSバッファー，10 × 濃度	● 200 mM MOPS, 50 mM sodium acetate,20 mM EDTA, pH 7.0
ローディングバッファー	● MOPS，脱イオン化フォルムアミド，フォルムアルデヒド，グリセロール，ブロモフェノールブルー（詳しくは操作方法を参照）
DIGラベルされたRNA分子量マーカー	● 抗DIG抗体により可視化される分子量マーカー. DIGラベルされたマーカー製品については，190ページのご注文情報またはウェブサイト（http:/www.roche-applied-science.com）を参照ください.
ノーザンブロットのトランスファー，プレハイブリダイゼーション，ハイブリダイゼーションに必要とされるもの	
ラベルされたRNAプローブ	● トランスクリプションによるラベリングより調製されます（本章の62ページ，セクション 2.3を参照ください）.
ポジティブチャージのナイロンメンブレン	● Cat. No. 1 209 272（20 × 30 cm） ● Cat. No. 1 209 299（10 × 15 cm） ● Cat. No. 1 417 240（0.3 × 3 m ロール）
Whatman 3 MM紙	● キャピラリートランスファー用
UVトランスイルミネーター，またはUVクロスリンカー	● RNAをナイロンメンブレンに固定するために使用します.
ウォーターバス，68℃	● プレハイブリダイゼーション溶液やハイブリダイゼーション溶液をあらかじめ温めるために使用します.

設　備 / 試　薬	説明および目的
振とう式ウォーターバス, 68℃	● プレハイブリダイゼーションやハイブリダイゼーションのインキュベーションおよび, ストリンジェント洗浄に使用します.
DIG Easy Hyb顆粒（ハイブリダイゼーションバッファー）	● Cat. No. 1 796 895, または ● DIG Northern Starter Kit, Cat. No. 2 039 672に含まれます（詳しくはセクション 2.3を参照ください）. ***ノート：***顆粒を溶かして調製したDIG Easy Hybバッファーは室温で 1ヶ月間安定です.
ハイブリダイゼーションバッグ	● Cat. No. 1 666 649（50バッグ；25 × 24 cm）
プラスチックまたはガラス製のインキュベーション用トレー	● ストリンジェント洗浄用
低ストリンジェンシーバッファー	● 0.1% SDS, 2 × SSC
高ストリンジェンシーバッファー	● 0.1% SDS, 0.1 × SSC

3. 2. 2 操作方法

以下の操作全般において, RNaseフリーのガラス器具, プラスチック器具および溶液を使用することが極めて重要です. RNAハイブリダイゼーションのプロトコールは, 以下のフローチャートに示す操作に分けられます. それぞれの操作の所要時間も以下のチャートに示します.

3.2.2.1（97ページ）	**アガロースゲルでRNA試料を分離する**	2 時間〜オーバーナイト
▼		
3.2.2.2（98ページ）	**RNAをメンブレンへトランスファーする（ノーザンブロット）** ステージ A：RNAをナイロンメンブレンへキャピラリートランスファーする ステージ B：UVまたはベーキングによりRNAをメンブレンに固定させる	8 時間〜オーバーナイト 3 分間〜 2 時間
▼		
3.2.2.3（99ページ）	**DIG Easy Hybを用いたブロットのプレハイブリダイゼーション**	30分間
▼		
3.2.2.4（101ページ）	**DIGラベルRNAプローブとブロット上のRNAとをハイブリダイズさせる** ステージ A：ラベルされたプローブとブロッティングメンブレンをインキュベート ステー B：メンブレンを洗浄し, ハイブリダイズしなかったプローブを取り除く	6 〜16時間 45分間

1 このステージの操作は, ブロット上のRNAを検出するためのDIGラベルされたRNAプローブの使用について解説したものです. しかし, 操作 3.2.2.1〜3.2.2.4を必要に応じて改めることにより, DIGラベルされたDNAプローブを使用してRNAターゲットを検出することも可能です.102ページの「DIGラベルされたDNAプローブを用いてノーザンブロット上にあるターゲットRNAを検出するための方法」を参照ください.

ノート: このアイコンは, その操作の後にプロトコールを中断して, その産物を次の操作を開始するまで一時的に保存することが可能であることを示しています.

3. 2. 2. 1 アガロースゲルでRNA試料を分離する

ゲルでRNAを分離する方法はたくさんあります. 弊社では, 取扱い易さと信頼性の面からフォルムアルデヒド/MOPSゲルの使用をお薦めします.

ノート： ゲル中に臭化エチジウムを加えないでください. ゲル電気泳動とブロットのトランスファーに関して薦められる事項については, 第1章の19ページを参照ください.

ステップ	実験操作		時　間
①	以下の方法でゲルを調製します.		―
	溶　液	溶液の組成	
	10×MOPS, pH 7.0	● 200 mM MOPSバッファー ● 50 mM sodim acetate ● 20 mM EDTA ● NaOHを用いてpH 7.0に調整する.	
	泳動バッファー[1]	1×MOPS	
	ローディングバッファー[2]	● 250 μlの100%脱イオン化フォルムアミド ● 83 μlの37%フォルムアルデヒド ● 50 μlの10×MOPS ● 50 μlの100%グリセロール,RNaseフリー ***ノート：*** RNaseフリーのグリセロールを購入してください. あるいはバッファー中にグリセロールが全く含まれないようにしてください.グリセロールをオートクレーブすることはできません. グリセロールを含む試料を泳動する場合についての情報は, ステップ8を参照ください. ● 10 μlの2.5%ブロモフェノールブルー ● 57 μlのDMDC-またはDEPC- 処理水	
	1 MOPS泳動バッファーは, 使用前に必ずオートクレーブ滅菌してください. MOPSをオートクレーブすると, 黄色く変色して使用できなくなるという説があります. しかし, 弊社のMOPSバッファーはもともと黄色ですが, 常に使用可能です. 2 ローディングバッファーは, 試料と混和する直前に常に新しいものを調製してください.		
②	2%フォルムアルデヒドを含む1×MOPSバッファーを用いて, (分離するRNAのサイズに応じて) 1%～2%アガロースゲルを調製します. **例：** 141.9 mlの1×MOPSバッファーと8.1 mlの37%フォルムアルデヒド混合液に, 1.5～3.0 gのアガロースを溶かします. ゲル板に注ぎます.		30分間
③	2倍容の新しく調製したローディングバッファーに対して, 以下のいずれかを含む1倍容のRNA試料を混和させます. ● 1 μgのトータルRNA, または ● 100 ngのmRNA ***ノート：*** DIGラベルされたRNAプローブの使用をお薦めします. DNAプローブの使用については102ページ(3.2.3)を参照ください.		1 分間
④	分子量マーカーとして, 1レーン当たりおよそ5 μlのDIGラベルされたRNA分子量マーカー(ローディングバッファーと混和させたもの)をロードしてください. ***ノート：*** 必要となる量は, 予想されるハイブリダイゼーション産物のサイズに依存します. 試料のハイブリッドのサイズと同等のバンドが明瞭に現れるよう, 十分な量のマーカーをロードしてください.		―
⑤	RNA / ローディングバッファー混合液を, 65℃で10分間熱変性させます.		10分間

ステップ	実験操作	時　間
⑥	変性させた混合液を，氷上で1分間急冷します．	1分間
⑦	以下のいずれかの操作を行ってください． ● ローディングバッファーにグリセロールが含まれる場合，試料をゲルにロードした後ゲルを泳動バッファーに浸して，ステップ9に進んでください． ● ローディングバッファーにグリセロールが含まれない場合，ステップ8に進んでください．	―
⑧	(オプション)RNaseのコンタミネーションの可能性を避けるために，ローディングバッファーにグリセロールを加えなかった場合，以下の操作を行ってください． ● 試料をドライゲルへロードします． ● 慎重にゲルのスロットを泳動バッファーで満たします． ● 泳動バッファーを，ゲルの上面のところまで加えます(試料のスロットを越えないように)． ● ゲルを高電圧(＞3～4V/cm)で約10分間泳動し，試料をゲル内へ移動させます． ● 泳動バッファーを足して，ゲルを完全にバッファー中に沈めます．	10分間
⑨	RNAが明確に分離するまで，ゲルを3～4V/cmで少なくとも2時間(オーバーナイトが望ましい)泳動します．	2時間～オーバーナイト
⑩	ターゲットRNAの質を評価するため，ゲルを0.25～0.50 μg/ml の臭化エチジウムで手短に染色し，ゲルをUV光下で調べます．	15～30分間

3. 2. 2. 2 RNAをメンブレンへトランスファーする(ノーザンブロット，キャピラリートランスファー法)

ノート：アルカリ処理はターゲットRNAを壊し易いのでお薦めできません.アルカリ処理なしで11.5 kb の mRNAをトランスファーすることが可能なことから，アルカリ処理の必要はないと考えられます．

ステップ	実験操作	時　間
①	ゲルを20×SSC中に15分間×2回浸し，フォルムアルデヒドを除去します(フォルムアルデヒドはトランスファーを阻害することがあります)．	30分間
②	以下の方法でブロットトランスファーのセットアップを行います．気泡が入ることを防ぎながら操作を行ってください． ● Whatman 3MM紙1枚を20×SSCに浸し，20×SSCを入れた浅めの容器の中に置いた「ブリッジ」の上に乗せます． ● 20×SSCをしみこませたこのWhatman 3 MM紙の上にゲルを乗せます．滅菌済みのピペットをゲルの上で転がし，ゲルと紙との間に生じた気泡を取り除きます． ● ポジティブチャージのナイロンメンブレンをゲルの大きさに切ります． ● 乾いた状態のメンブレンを，ゲル泳動面の上に乗せます．上記と同様に，ピペットを使って気泡を取り除きます． ● ゲルと同じ大きさに切り抜いたWhatman 3 MM紙(乾いたもの)2枚，厚く重ねたペーパータオル，その上にガラス板，200～500 g の重りを乗せて完了です． ***ノート：***本章の88ページ，操作3.1.2.2のステップ6にあるブロットの「サンドイッチ」の完成図を参照ください．	15分間

ステップ	実験操作		時　間
③	RNAのトランスファーには,滅菌済みRNaseフリー20×SSCをトランスファーバッファーとして用いたRNaseフリーの条件下で行ってください.		6時間～ON
④	翌日に，トランスファーのために積み上げたものを取り除きます.		―
⑤	メンブレンが湿っている間に，以下のいずれかの方法でRNAをブロットに固定させます.		3分間～2時間
	固定に使用する設備	**固定のための操作方法**	
	UVクロスリンク	● (RNAのブロット面を上にした)メンブレンを2×SSCに浸漬したWhatman 3 MM紙に乗せます. ● メンブレンを湿ったままUV光に当てます. 標準的なプロトコールでは，トランスイルミネーターで1～3分間照射します[1]. ● 滅菌再蒸留水でメンブレンを手短に洗います. ● メンブレンを風乾させます.	
	ベーキング	● メンブレンを2×SSCで手短に洗い，余分な塩を取り除きます[2]. ● 以下のいずれかの方法でメンブレンをベークします. ● 120℃にて30分間，または ● 80℃にて2時間	
	1 弊社ではRNAの架橋固定にはUV Stratalinkerを使用しています(120 mJにて). UVトランスイルミネーターを使用することも可能ですが,経験的にUVの照射時間を決定する必要があります. 一般的に短波長のUVでは1分間以内の照射でクロスリンクをさせることが可能です. 長波長のUVでは2～3分間照射を行ってください. トランスイルミネーターによっては，5分間の照射を必要とするものがあります. 2 ベーキングの際に20×SSC(トランスファーバッファー)がメンブレン上にベークされないように注意します. 乾燥による塩結晶は，化学発光検出アッセイの際に「星状」のシグナルを生じます.		
⑥	以下のいずれかの操作に進んでください.		―
	何をしたいか	**どうすればよいか，また，本書のどこを見ればよいか**	
	操作を続けたい	メンブレンを操作3.2.2.3にそのまま使用します.	
	操作をここで中断し，次回使用するまでメンブレンを保存したい	乾燥させたブロットをWhatman 3 MM紙ではさみ，シールできるバッグに入れて4℃で保存します.	

3. 2. 2. 3 DIG Easy Hybを用いたブロットのプレハイブリダイゼーション

ノート：

- 操作3.2.2.3および3.2.2.4を利用してドットブロット上のRNAの検出を行うことが可能です.
- プレハイブリダイゼーション，ハイブリダイゼーションおよび検出(本章のセクション4)の過程で，メンブレンを絶対に乾燥させないでください. メンブレンが乾燥したり，(ブロットを複数同時に処理している場合など)メンブレンどうしがくっついたりすると，高いバックグラウンドを生じます.

例外：高ストリンジェント洗浄の後では，メンブレンを風乾させ，次回解析に使用するまで4℃で保存することが可能です. ただし，保存されたメンブレンからプローブを剥離したりリプロービングしたりすることはできません.

ステップ	実験操作	時　間
①	DIG Easy Hyb顆粒の入ったプラスチックボトルに64 mlの滅菌かつDMDCまたはDEPC処理済みの再蒸留水を加え，顆粒を再懸濁させます．37℃で5分間撹拌し，顆粒を溶かします．	5分間
②	下記のそれぞれの操作にどのくらいの量のDIG Easy Hybが必要であるかを決定します．インキュベーションの間，メンブレンを完全に覆うのに十分な量のバッファーが必要になります． ***例：***ハイブリダイゼーションバッグを用いる場合，100 cm^2（10 cm × 10 cmなど）のメンブレンに対する必要量は以下の通りです： ● プレハイブリダイゼーションのステップでは，10〜15 mlのDIG Easy Hybが必要． ● ハイブリダイゼーションのステップでは，3.5 mlのDIG Easy Hybが必要．	2〜3分間
③	正確な量（上記ステップ2で計算）のDIG Easy Hybを滅菌済みのチューブに入れ，そのチューブを68℃に設定されたウォーターバスに設置します． ***Tip：***RNA：RNAハイブリダイゼーションでは，DIG Easy Hybを用いたプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの正確な温度は68℃になります．しかし，ヘテロガスなRNAプローブを使用する場合は，プレハイブリダイゼーションやハイブリダイゼーションの温度を変更する必要があります．	2〜3分間
④	ブロットをハイブリダイゼーションバッグ（Cat. No. 1 666 649）内に置きます． ***ノート：***プレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションのステップは，耐熱性プラスチックバッグ，ガラス製ボックス，ペトリ皿，ローラーボトルやシール式プラスチックバッグなど，密封できるものであればどのような容器でもほぼ代用することが可能です．容器はハイブリダイゼーションバッファーからNH_4が放出されインキュベーションのpHが変化しないよう，操作中の密閉性が必要です．	2〜3分間
⑤	● あらかじめ温めておいたDIG Easy Hybを適量（100 cm^2当たり10〜15 ml）バッグに入れます． ***Tip：***十分な量のバッファーをバッグに入れると，シールした後のバッグはやや膨らんで見えます． ● 弊社のハイブリダイゼーションバッグを使用する場合，蛇口の部分を取り除き（切り取る），気泡を取り除きながらバッグのブロットの周囲をシールしてください．	2〜3分間
⑥	● ハイブリダイゼーションバッグを循環式ウォーターバスの底に水平に設置します． ● バッグの隅の上に重りを置き，固定します（重りはブロットに触れないこと）． ● ブロットを68℃で少なくとも30分間インキュベートします．プレハイブリダイゼーションのステップの間，メンブレンがおだやかに振とうするように，重りの位置を調節します．	30分間
⑦	以下のいずれかの操作に進んでください．	

何をしたいか	どうすればよいか，また，本書のどこを見ればよいか
操作を続けたい	メンブレンを操作 3.2.2.4にそのまま使用します．
操作を続ける前に，しばらく時間を置きたい	メンブレンをDIG Easy Hyb中で振とうしたまま，数時間放置します．このステップは結果に影響しません．

3. 2. 2. 4 DIGラベルされたRNAプローブとブロット上のRNAとをハイブリダイズさせる

ステップ	実験操作	時　間
①	プレハイブリダイゼーションのインキュベーション（操作3.2.2.3のステップ6）の間に，以下の方法でハイブリダイゼーション溶液を調製します： ● DIGラベルされたRNAプローブの必要量を決定します． *Tip：*トランスクリプションによりラベルされたRNAプローブの濃度は，ハイブリダイゼーションバッファー1 ml当たり100 ngをお薦めします． ● ラベリング反応産物が入ったチューブから，適切な量のラベルされたプローブを取り出します． ● ラベルされたプローブを50 μlのRNaseフリー再蒸留水とともにマイクロ遠心チューブに入れます． ● マイクロ遠心チューブを沸騰中のウォーターバスに5分間設置し，プローブを変性させます． ● 氷水中でプローブを急冷します． ● チューブを手短に遠心します． ● あらかじめ温めておいたDIG Easy Hybが適量（100 cm^2当たり3.5 ml）入ったチューブに，変性させたプローブを速やかに加え，チューブを倒置転倒させて混和させハイブリダイゼーション溶液を作成します．	10分間
②	以下の方法でブロットにハイブリダイゼーション溶液を加えます： ● シールされたハイブリダイゼーションバッグを切り開けて，プレハイブリダイゼーションバッファーを流し出します． ● **直ちに**，DIGラベルされたプローブを含むハイブリダイゼーション溶液をバッグに加えます． ● 気泡を除きながら，バッグの周囲をシールします．	2～3分間
③	● ハイブリダイゼーションバッグを，68℃に設定された振とう式ウォーターバスの底に水平に設置します． ● バッグの隅の上に重りを置き，固定します（重りはブロットに触れないこと）． ● ブロットをプローブを含むハイブリダイゼーション溶液中で68℃にて6～16時間インキュベートします． ● インキュベーションの間，メンブレンがおだやかに振とうするように重り位置を調節します． *Tip：*オーバーナイトのハイブリダイゼーションを薦めますが，高感度を必要としない場合には，インキュベーションを短くすることができます．ハイブリダイゼーションの大部分は6時間後に完了します．	6～16時間
④	ハイブリダイゼーションが完了したら，以下の操作を行います： ● RNaseフリーのプラスチック容器（トレー，ディッシュなど）に，メンブレンが十分覆われる量の低ストリンジェンシーバッファー（0.1 % SDS, 2 × SSC）を入れます． ● バッグを切り開けてハイブリダイゼーション溶液を流し出します． ● 直ちに，メンブレンを低ストリンジェンシーバッファーの入ったプラスチック製トレーの中に入れます．	2分間
⑤	● トレーを室温で5分間，振とうしながらインキュベートします． ● 使用済みのバッファーを捨て，直ちに200 mlの新しい低ストリンジェンシーバッファーを加えます． ● トレーをさらに室温で5分間，振とうしながらインキュベートします．	10分間
⑥	ステップ5のインキュベーションの間に，高ストリンジェンシーバッファー（0.1 % SDS, 0.1 × SSC）を68℃に温めておきます．	―

ステップ	実験操作	時　間
⑦	● 低ストリンジェンシーバッファーを捨てます. ● 直ちに, あらかじめ温めておいた高ストリンジェンシーバッファーをブロットが入った容器に加えます. ● 高ストリンジェンシーバッファーを用い, ブロットを68℃にて15分間×2回, 振とうしながら洗浄します. ***ノート：***プローブとターゲットRNAとのホモロジーが80%に満たない場合, このステップの洗浄温度を低くする必要があります(経験的に決定してください.).	30分間

3.2.2.5 次に行うこと

何をしたいか		どうすればよいか, また, 本書のどこを見ればよいか
ハイブリダイゼーションの結果を見たい	⇒	本章の106ページ, セクション 4 の「ブロット上にハイブリダイズしたプローブを検出するテクニック」を参照ください.
RNAハイブリダイゼーションのプロトコールを最適化させる方法を学びたい	⇒	本章の103ページ, セクション3.3の「ブロットから最良の結果を得るために」を参照ください.
DIGラベルされたRNAプローブを用いて得られた代表的な実験例を見たい	⇒	本章の113ページ, セクション4.1.4の「化学発光検出アッセイを用いた代表的な実験結果」を参照ください.

3.2.3 DIGラベルされたDNAプローブを用いてノーザンブロット上にあるターゲットRNAを検出するための方法

DIGラベルされたRNAプローブの代わりにDIGラベルされたDNAプローブを使用して, RNAターゲットを検出しようとする場合, 操作 3.2.2.1～3.2.2.4を以下のように変更させる必要があります：

RNAプローブの代わりにDNAプローブを使用する場合に変更するパラメーター	変更の仕方	変更されるステップ
ゲルに泳動させるRNA量	ゲル当たりのRNA量を増やします. ● トータルRNAは 5 μg ● mRNAは 500 ng	● 操作 3.2.2.1, ステップ 3
プレハイブリダイゼーション, ハイブリダイゼーションおよび高ストリンジェンシー洗浄の温度	● 温度を50℃に下げてください.	● 操作 3.2.2.3, ステップ 3 および 6 ● 操作 3.2.2.4, ステップ 3, 6 および 7
ハイブリダイゼーション中に使用するラベルされたプローブの量	ハイブリダイゼーションバッファー 1 ml 当たりDIGラベルされたDNAプローブ濃度を20～50 ngに変更してください.	● 操作 3.2.2.4, ステップ 1

3. 3 ブロットから最良の結果を得るために

3. 3. 1 電気泳動，ブロッティング，ハイブリダイゼーションに関する大切なヒント

テクニック	ヒント
電気泳動	● ゲルへターゲット核酸を多量にロードしないでください．ゲル上にターゲットが過多に存在すると，プローブが目的でない分解産物を検出してしまうことがあります． ● ターゲット核酸をアガロースゲルで分離する際,ゲル中に臭化エチジウムを加えないでください.ゲルを十分な時間泳動しない場合に,エチジウムが不均一なバックグラウンドを生じることがあります．
ブロッティング	● メンブレンに触れる際は，必ず手袋を着用し，ピンセットを用いてメンブレンの端のみを持つように扱ってください． ● ブロッティングの「サンドイッチ」をセットアップする際に，メンブレンの上に乗せる乾いたWhatman紙やペーパータオルの束が，ゲルやゲル下のバッファーを含んだ紙やスポンジに触れていないことを確認してください．パラフィルムをゲルの周りに置いて，上記のような接触を防ぐようにしてください． ● ブロッティングの「サンドイッチ」に使用する重りは，ゲルのサイズに応じて変えてください．ミニゲルには 200 gまで，最大でも(20 × 20 cmのゲルに対し)500 gまでが良いでしょう． ● オーバーナイトでブロットをトランスファーする間に,「サンドイッチ」の一番上にあるペーパータオルの束が完全に水を吸った状態にならないようにしてください．必要に応じて，湿ったペーパータオルを乾いたものに換えてください．
プレハイブリダイゼーション	● プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションのインキュベーションには十分な量のバッファーを使用し，常にメンブレンがバッファーに覆われているようにしてください．必要量は，インキュベーションに使用する容器の形や大きさに依存します． ● 同じ容器の中で複数のブロットを処理する場合は,インキュベーションに十分な量の溶液を使用し，ブロットどうしがくっつかないように注意してください．振とうする時，ブロットが溶液中を動くようにします． ● プレハイブリダイゼーションの開始からプローブハイブリッドの可視化(本章のセクション 4)までの間，メンブレンを絶対に乾燥させないでください．メンブレンが乾燥したり他のメンブレンにくっつくことにより，そのアッセイで高いバックグラウンドが生じます．

テクニック	ヒント
ハイブリダイゼーション	● DIG Easy Hybを用いたハイブリダイゼーションにおける最適な温度は37℃～42℃（DNA:DNA），68℃（RNA:RNA），または50℃（DNA:RNA）です．ただし，プローブのGC含量が高い（>50%）場合や，ターゲットとのホモロジーが不完全な（<80%）場合には，温度を変える必要があるかもしれません． より詳しい情報については，158ページの付録Aを参照ください． ● メンブレンの乾燥を防ぐため，プローブを含んだハイブリダイゼーション溶液の調製を済ませてからプレハイブリダイゼーションバッファーを流し出してください． ● ハイブリダイゼーションバッファーは，常にあらかじめ温めてからメンブレンに加えてください．あらかじめ温めることで，プローブの再アニールによる二次構造や，メンブレンへの非特異的な結合が防止されます． ● プローブの濃度はハイブリダイゼーションの成功の鍵をにぎります．ラベルされたプローブの濃度を正確に算出するために，直接検出法（セクション 2.5）またはゲル電気泳動法（セクション 2.2.2.2; PCRラベルされたプローブのみ）を使用してください．それからハイブリダイゼーションバッファーに加えるプローブの量を決めてください． ● プローブは使用前に必ず熱変性（68℃，10分間）させてください（ただし沸騰させないで）．1 本鎖のプローブでも，二次構造を生じている場合があるため，最適なハイブリダイゼーションを実行するためには二次構造をなくす必要があります． ● プレハイブリダイゼーション溶液，ハイブリダイゼーション溶液およびプローブに必要な使用量を最少におさえるため，ブロットの周囲ぎりぎりのところを熱シールしてください． ● DIGラベルされたプローブは少なくとも 1 年間安定です．DIGラベルされたプローブをハイブリダイゼーションバッファー中で保存すると，数回（通常 3 ～ 5 回）再利用が可能です．ただし，RNAプローブは非常に不安定でRNaseフリーの状態を維持することが難しいため，RNAプローブを含むハイブリダイゼーション溶液の保存や再利用は薦められません．
ハイブリダイゼーション後の洗浄	● 洗浄の間のメンブレンの乾燥を防ぐため，次のステップで使用する新しい溶液が調製されるまで，前のステップの溶液を流してしまわないでください． ● DNAプローブとターゲット核酸とのホモロジーが 80%未満である場合，高ストリンジェント洗浄の操作指示（操作 3.1.2.4のステップ 7）よりも低めの温度（60℃など）で行う必要があります． ● DNAプローブのGC含量が高い場合（50%以上），高ストリンジェント洗浄のバッファーに0.1 % SDS，0.1 × SSCを使用し，温度を68℃に上げてください． ● 高ストリンジェント洗浄バッファーは，必ずあらかじめ温めてから使用してください．温めずに使用すると，高ストリンジェント洗浄中にバッファーは適切な温度まで到達しません．

3. 3. 2 ハイブリダイゼーションブロットに関するトラブルシューティング

トラブルとなる問題	原因と考えられること	薦められる解決方法
メンブレン上の核酸量が少ない	キャピラリートランスファーが効率よく行われなかった	● ブロットトランスファーの後，ゲルを臭化エチジウムで染色し，核酸が効率よくトランスファーされたことを確認してください. ● 先のブロッティングに関する「大切なヒント」を参照ください.
	ターゲット核酸が分解してしまった	● ターゲットのDNAやRNAの量や完全な状態かどうかを確認してください. ● RNAの調製や使用時には，常にRNaseフリーの条件を厳守してください. ● 新たにターゲットのDNAやRNAを調製してブロッティングを再度行ってください.
プローブの感度が低い	プローブが効率よくラベルされていない	● 全ての，セクション2で薦められている事項に従って，テンプレートの調製を行ってください. ● セクション 2.1 ～ 2.3のトラブルシューティングガイドを参考に改善を行ってください.
	ターゲットが分解されてしまった	● 新しくテンプレートを調製してください.
	プローブ濃度が低すぎる	● プローブ濃度を高くしてください（ハイブリダイゼーションバッファー 1 ml 当たり，DIGラベルRNAプローブ100 ngまたはDIGラベルDNAプローブ25 ngを上回らないこと）. ● ハイブリダイゼーションをオーバーナイトで継続して行ってください.
	検出アッセイに問題がある	● 検出アッセイのトラブルシューティングガイド（本章のセクション4.1.3）を参照ください.
ブロットのバックグラウンドが高い	試料中のターゲット濃度が高すぎる	● DNAプローブを使用する場合,サザンブロットではヒトジェノミックDNAでは 5 μg,植物ジェノミックDNAでは 10 μg,プラスミドDNAでは 1 ngを上回る量を使用しないでください. ● オリゴヌクレオチドプローブを使用する場合,サザンブロットではヒトジェノミックDNAでは10 μg,プラスミドDNAでは 2 ngを上回る量を使用しないでください. ● RNAプローブを使用する場合，ノーザンブロットでは1レーン当たりトータルRNAでは 1 μg，mRNAでは100 ngを上回る量を使用しないでください. ● DNAプローブを使用する場合,ノーザンブロットではトータルRNAでは 5 μg，mRNAでは 500 ngを上回る量を使用しないでください.
	プローブ濃度が高すぎる	● プローブ濃度を低くしてください（上記の「感度が低い」場合の最高濃度のガイドラインを参照ください）. ● 経験的に最適なプローブ濃度を決定してください.
	メンブレンのタイプが適切でない	● ロシュ・ダイアグノスティックス社のポジティブチャージのナイロンメンブレンを使用してください. DIGシステムに対して試験済みです.
	操作中にメンブレンが乾燥した	● プレハイブリダイゼーション，ハイブリダイゼーション，検出の操作中にメンブレンを乾燥させてはいけません. ● 常にメンブレンが溶液に完全に覆われていることを確認してください.
	ストリンジェント洗浄が効果的でない	● ストリンジェント洗浄の温度を確認してください. ● 常に洗浄溶液を適切な温度まで温めてから使用してください. ● ノーザンブロットでは，高ストリンジェント洗浄の温度を70℃に上げてください.
	その他の理由	● 本章の検出におけるトラブルシューティングガイド（セクション4.1.3）を参照ください. ● さまざまなバックグラウンドの問題については，付録Bを参考に改善を行ってください.

4. ブロット上にハイブリダイズしたプローブを検出するテクニック

ハイブリダイゼーション(セクション3)が完了したら，このセクション内のいずれかの方法を利用してプローブとターゲットとのハイブリッドを検出しましょう．このセクションで解説される方法は，以下の通りです：

トピックの情報		セクション	ページ
化学発光法によるブロット上にハイブリダイズしたプローブの検出 **主要な製品**：ready-to-use のCSPDとCDP-*Star*	⇒	4.1	106
発色法によるブロット上にハイブリダイズしたプローブの検出 **主要な製品**：NBT/BCIP ストック溶液,	⇒	4.2	115

4. 1 化学発光法によるブロット上にハイブリダイズしたプローブの検出

プローブとターゲットとのハイブリッドを検出する上で最も感度の高い方法は，アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体とアルカリホスファターゼの化学発光基質(光を発する)になります．このセクションでは，アルカリホスファターゼの化学発光基質，CSPDおよび*CDP-Star* を用いてサザンブロットやノーザンブロット上のプローブとターゲットとのハイブリッドを可視化させる方法について解説します．このセクションのトピックは以下の通りです：

トピックの情報		ページ
化学発光検出に必要な材料	⇒	107
操作方法： ● 化学発光アッセイによりプローブとターゲットとのハイブリッドを可視化させる	⇒	108
● 次に行うこと	⇒	110
化学発光検出法のトラブルシューティング	⇒	110
化学発光検出アッセイを用いた代表的な実験結果	⇒	113

4. 1. 1 化学発光検出に必要な材料

試　薬	説明および目的
メンブレンの洗浄および ブロッキングバッファー	● DIG Wash and Block Buffer Set（DNase and RNase free）, Cat. No. 1 585 762
アルカリホスファターゼ 標識抗DIG抗体	● Cat. No. 1 093 274にて別売されています. ● DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Cat. No. 1 585 614にも含まれています. ● DIG Northern Starter Kit, Cat. No. 2 039 672にも含まれています.
アルカリホスファターゼの化学発光基質として, 次のいずれかを選んで使用してください：	
● Ready-to-use CSPD	● Cat. No. 1 755 633にて別売されています. ● DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Cat. No. 1 585 614にも含まれています.
● Ready-to-use CDP-*Star*	● Cat. No. 2 041 677にて別売されています. ● DIG Northern Starter Kit, Cat. No. 2 039 672にも含まれています.
化学発光を記録するシステムとして, 次のいずれかを選んで使用してください：	
● イメージャー	
● Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	● Cat. No. 1 666 657 / 1 666 916 ● 化学発光を可視化させるために適したX-線フィルムです.

4. 1. 2 操作方法

化学発光検出の各操作とそれぞれのステージの所要時間を以下のチャートに示します.

4.1.2.1 （108ページ）	***プローブとターゲット核酸との ハイブリッドを化学発光により可視化させる***	
	ステージ A：メンブレンの洗浄とブロッキング	35分間
	ステージ B：抗DIG抗体を用いプローブとターゲットとのハイブリッドの局在をつきとめる	30分間
	ステージ C：結合しなかった抗体をメンブレンから洗い流す	30分間
	ステージ D：化学発光によりブロット上のDIGを検出する	10分～45分間

4. 1. 2. 1 プローブとターゲット核酸とのハイブリッドを化学発光により可視化させる

実験を始める前に：まず検出操作に使用する溶液を調製します.

ワーキング溶液	組成と調製方法	保存と安定性
マレイン酸バッファー[1]	0.1 M マレイン酸, 0.15 M NaCl ; NaOH（固体）を用いてpH 7.5に調整します.	室温で安定.
ブロッキング溶液[2]	マレイン酸バッファーを用いて，10×濃度のブロッキング溶液を 1：10に希釈します.	使用時に新たに調製してください.
洗浄バッファー[1]	0.1 M マレイン酸, 0.15 M NaCl ; pH 7.5; 0.3%（v/v）Tween 20	室温で安定.
抗体溶液[2]	使用時ごとに抗ジゴキシゲニン-APをもとのバイアルのまま10000 rpmにて 5 分間遠心し，必要量を上清から慎重にピペットで採取します. ブロッキング溶液を用いて, 抗ジゴキシゲニン-APを 1：10000（75 mU/ml）に希釈します.	使用時に新たに調製してください.（4℃で 2 時間安定）
検出バッファー[1]	0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5（20℃）	室温で安定.

1 これらの濃縮ストック溶液（10×）は, DIG Wash and Block Buffer Set の一部として発売されています. 特に指定がない限り, 滅菌再蒸留水を用いて希釈し, 実際に使用する溶液を調製してください. RNAの検出には, DMDC-またはDEPC-処理水を使用してください.
2 （希釈されていない）ストック試薬は, DIG High Prime Starter Kit II のバイアル 4 や, DIG Northern Starter Kit のバイアル 5 として含まれています. また, 粉末の製品（Cat. No. 1 096 176）としても別売されています.

ノート：

- 特に指示がない限り，以下のインキュベーションは全て室温にて振とうしながら行ってください.
- 下記の容量は，10 cm × 10 cm（100 cm^2）のブロットをプラスチック製トレーを用いて処理する場合のものです. 小さめのブロット（コロニー/プラークハイブリダイゼーション用メンブレンディスクなど）を処理する場合や小さめの容器を使用する場合には, 容量を少なくすることができます. メンブレンが完全に覆われる十分量の溶液を用い, 振とう時にメンブレンが容器にくっつかないように注意してください.
この操作におけるステップ 6 ～ 9 の変法として, トランスパランシー（transparency）テクニック（本章の133ページ, セクション6.1.2.3に解説されています）を使用することが可能で, 化学発光基質を節約する方法です.

ステップ	実験操作	時　間
①	● 100 ml の洗浄バッファーが入ったプラスチック容器（トレーなど）にメンブレンを移します. ● 室温にて振とうしながら2分間インキュベートします. ● 洗浄バッファーを捨てます.	2 分間
②	● 100 ml のブロッキング溶液をトレーに加えます. ● メンブレンを振とうしながら30分間インキュベートします. *Tip：*このブロッキングのステップは，3 時間まで延長させることが可能です. 結果への影響はありません. ● ブロッキング溶液を捨てます.	30分間

ステップ	実験操作	時　間
③	●20 ml の抗体溶液をトレーに加えます. ●振とうしながら，メンブレンを30分間インキュベートします. ●抗体溶液を捨てます.	30分間
④	100 ml 量の洗浄バッファーで，メンブレンを15分間×2回洗浄します.	2×15分間
⑤	20 ml の検出バッファーでメンブレンを 3 分間平衡化させます.	3 分間
⑥	手袋を着用し，以下の方法で化学発光基質をブロットに加えます： ●（DNA / RNAのブロット面を上にした）メンブレンを 発光展開用フォルダー（アセテート製シート）やハイブリダイゼーションバッグ, その他の密閉可能な封筒型容器の内側に置きます. ***ノート：***メンブレンをプラスチック製ラップで**包まないでください.**ラップでは密閉ができません. ●メンブレン100 cm^2 に対して 1 ml（20〜30滴）のReady-to-use CSPD または CDP-*Star* を滴下します. ブロット面全体へ均一に基質溶液がかかるまで滴下してください. ●**基質を加えたら，直ちに**溶液がかかったメンブレンをシートやバッグのもう一方の面で覆い,（表面張力により）基質がメンブレンに均一に広がるようにします. メンブレンとシートやバッグとの間に気泡が入らないよう注意してください.	2 分間
⑦	●メンブレンを室温で 5 分間インキュベートします. ●過剰な溶液をしごき出し，メンブレンぎりぎりのところでシートやバッグの両側をシールします.	5分間
⑧	以下のいずれかの操作を行ってください： ●CSPDを使用する場合,（シールされたシートやバッグ内で）基質を加えたメンブレンを37℃,10分間インキュベートし,化学発光反応を増強させます. ●CDP-*Star* を使用する場合, このステップをとばしてステップ9に進みます.	0 〜10分間
⑨	（シールされた）メンブレンを以下の方法により室温で露光させます. ●イメージャー（5〜20分間） ●Lumi-Film X線フィルム（15〜25分間）	5 〜25分間
⑩	ステップ 9 の結果に基づき, 露光時間を調節しながらバンドパターンの強弱を決めます. ***Tip：***基質を加えてから最大 2 日間まで露光を繰り返すことが可能です.	

4. 1. 2. 2 次に行うこと

何をしたいか		どうすればよいか，また，本書のどこを見ればよいか
化学発光検出法を用いて得られた代表的な実験例を見たい.	⇒	本章の113ページ, セクション 4.1.4を参照ください.
メンブレンからプローブを剥離し，他のプローブをメンブレンへハイブリダイズさせたい.	⇒	本章の122ページ, セクション 5 の「メンブレン上のプローブの剥離とリプロービングのテクニック」を参照ください.
メンブレンを次に使用するまで保存したい.	⇒	本章の122ページ, セクション 5 の「メンブレン上のプローブの剥離とリプロービングのテクニック」を参照ください.

4. 1. 3 化学発光検出法のトラブルシューティング

トラブルとなる問題	原因と考えられること	薦められる解決方法
感度が低い	プローブが効率よくラベルされていない	● 直接検出法（第 2 章, セクション 2.5）またはゲル電気泳動法（第 2 章, セクション 2.2.2.2 ; PCRラベルされたプローブのみ）のいずれかを用いてDIGラベルされたプローブのラベリング効率を確認してください. ● セクション 2.1～2.3のトラブルシューティングガイドを参考に改善を行ってください.
	ラベルされたプローブ濃度が低すぎる	● プローブ濃度を高くしてください（ハイブリダイゼーションバッファー 1 ml 当たり，DIGラベルRNAプローブ100 ngまたはDIGラベルDNAプローブ25 ngを上回らないこと）. ● ハイブリダイゼーションをオーバーナイトで継続して行ってください.
	メンブレンのタイプが適切でない	● ロシュ・ダイアグノスティックス社のポジティブチャージのナイロンメンブレンの使用をお薦めします. Biodyne A（Pall社）など他のタイプのナイロンメンブレンも使用に適していますが，X-線フィルムへの露光時間が長くかかります. ● ニトロセルロースメンブレンは化学発光検出の操作に使用できません.
	効果的にハイブリダイゼーションが行われなかった	● ハイブリダイゼーション溶液中のDIGラベルされたプローブ濃度を高めてください（プローブ濃度の上限については，上記を参照ください）. ● ハイブリダイゼーション温度を確認してください.
	露光前のインキュベーションが十分でない（CSPDの場合のみ）	● メンブレンをX-線フィルムに露光させる前のインキュベーション時間（操作 4.1.2.1のステップ 8）を長くしてください（30分～12時間以内まで）.
	露光時間が十分でない	● フィルムへの露光時間を長くしてください. ● フィルムのタイプが感度に影響することがあります. Kodak XARやDuPont Cronex 4は弊社にて試験済みで, お薦めすることができます.

トラブルとなる問題	原因と考えられること	薦められる解決方法
バックグラウンドが高い	プローブが効率よくラベルされていない	● ラベリングの前に，テンプレートをフェノール/クロロフォルム抽出 and / or エタノール沈殿により精製してください. ● テンプレートの保存に, EDTAを含むバッファーを使用しないでください. ● プローブ内にクロスハイブリダイズの原因となるベクターシークェンスが含まれないことを確認してください.
	ラベルされたプローブ濃度が高すぎる ***ノート：***バックグラウンドが高くなる原因の中でも最も一般的	● DIGラベルされたプローブの濃度を低くしてください（ハイブリダイゼーションバッファー 1 ml 当たり, DIGラベルRNAプローブ100 ng または DIGラベルDNAプローブ25 ngを上回らないこと）. ● 経験的に，最適なプローブ濃度を決定してください. ***ノート：***ターゲット核酸を含まないメンブレンに対して，プローブ濃度を徐々に高くしながらハイブリダイゼーションを行うことにより，厳密なプローブ濃度の限界（バックグラウンドを除くための）を決定することができます.（171ページの付録Bにある「シングルコピー遺伝子の検出をより簡単に最適化するには」を参照ください.）
	サンプル中のターゲット濃度が高すぎる	● セクション 3.1.2.1および 3.2.2.1に示されている，ターゲット核酸量を上回らないようにしてください.
	ストリンジェント洗浄が効果的でない	● 常に洗浄溶液を適切な温度まで温めてから使用してください. ● ストリンジェント洗浄の温度を確認してください. ● **ノーザンブロットのみ：**必要に応じて高ストリンジェント洗浄の温度を70℃に上げてください.
	メンブレンのタイプが適切でない	● 弊社の機能試験を通過したポジティブチャージ・ナイロンメンブレンを使用してください. ***ノート：***プロトコールはポジティブチャージ・ナイロンメンブレンの使用のために最適化されているものの，他社のポジティブチャージ・ナイロンメンブレンの中には非常にチャージが強くバックグラウンドを生じるものがあります（さらに詳しい情報については, 第 1 章のセクション 5.1を参照ください）. ● メンブレンによっては，ロット間差が問題となる場合があります.
	操作中にメンブレンが乾燥した	● プレハイブリダイゼーション，ハイブリダイゼーション, 検出の操作中にメンブレンを乾燥させてはいけません. ● それぞれのステップでメンブレンが溶液に完全に覆われていることを確認してください. プレハイブリダイゼーション，ハイブリダイゼーションおよび検出のステップに使用するトレーのサイズにより，操作に必要なバッファーの量は変わります. ● それぞれのステップで, 溶液を流し出してから次の溶液を加えるまでの時間を最小限にしてください. これは, 検出の操作中におけるメンブレンの乾燥を防ぎます. ● 化学発光基質を加えたらすぐにバッグやシートの一方でメンブレンを覆い，乾燥を防いでください. ● 化学発光基質を加えるステップで, プラスチック製ラップを使用しないでください. ラップでは密閉ができないため，メンブレンが乾燥しやすくなります. また, ラップのしわに基質がたまり, その部分に高いバックグラウンドを生じることもあります. きっちりと密閉できる透明のバッグやシートを使用してください.

トラブルとなる問題	原因と考えられること	薦められる解決方法
	抗体濃度が高すぎる	● 抗DIG-APの濃度を低くしてください. ● 洗浄溶液とブロッキング溶液の容量を増やし，さらに洗浄とブロッキングのステップを2回ずつ行ってください. ● 抗DIG-APを使用する前に遠心し，調製物中に形成された沈殿物を分離してください. ● 抗体反応ではメンブレンを30分より長くインキュベートしないでください.
	露光前のインキュベーションが長すぎる（CSPDのみ）	● メンブレンをX-線フィルムに露光させる前のインキュベーション時間（操作 4.1.2.1のステップ 8）を短くしてください.
	露光時間が長すぎる	● X-線フィルムやイメージャーへの露光時間を短くしてください. シグナルの強度は時間がたつほど強くなります.
スポット状のバックグラウンドを生じる	抗体に高分子の複合体が含まれている	● 常に抗体のオリジナルバイアルを最高速度で 5 分間遠心し,（上清から）必要量を採取して抗体溶液の調製に使用してください.
	SSCの結晶	● ベーキングで核酸を固定させる前に，2×SSCを用いてメンブレンを手短に洗ってください.
	プローブにタンパクが混入している	● 孔径 0.45 μmのセルロースアセテート製フィルター（Schleicher and Schuell社など）を用いてラベルされたプローブをろ過してください. ***ノート：***プローブがフィルターに結合してしまうので，ニトロセルロース製フィルターを使用しないでください. ● High Pure PCR Product Purification Kitを用いてプローブを精製してください.
ノーザンブロット上に特異的だが不要なバンドが見られる	トランスクリプション用プラスミド中のSP6, T3またはT7のシークェンスがリボゾームRNAと相補的である.	● DIGラベルRNAプローブを使用する場合,ターゲットRNA量を減少させてください.1 レーン当たりトータルRNAでは 1 μg, mRNAでは 100 ng 以上の量を使用しないでください. ● トータルRNAからmRNAを調製し，精製されたmRNAをターゲットとして使用してください.

4. 1. 4 化学発光検出アッセイを用いた代表的な実験結果

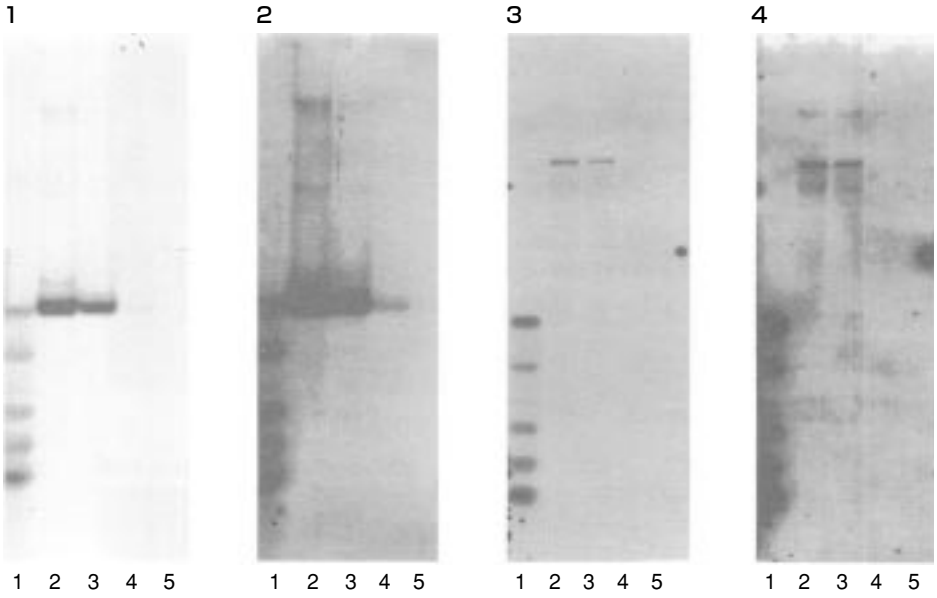


図 15. DIGラベルされたRNAプローブを用いたヒトの希少なmRNAの検出. 2 枚 1 組の同一のノーザンブロットを調製した. ヒト骨由来mRNAを試料(レーン 2, 100 ng ; レーン 3, 50 ng ; レーン 4, 5 ng ; レーン 5, 1 ng)とした. DIGラベルRNA分子量マーカー(レーン 1)を含めて泳動した. 左のブロット(パネル 1と 2)は, 発現度の高いアクチンmRNAに相補的なアンチセンスRNAをDIGラベルしたものをプローブとして検出された. 右のブロット(パネル 3 と 4)は, 転写ファクターCTF1という希少なmRNAに相補的なアンチセンスRNAをDIGラベルしたものをプローブとして検出された. それぞれのハイブリッドは化学発光アッセイにより可視化され, ブロットはX-線フィルムに15分間(パネル 1 と 3), 90分間(パネル 2 と 4)露光された.
結果および結論：DIGラベルRNAプローブはトータルRNAの, わずか 5 ng中から発現度の高いアクチンmRNAを, また, わずか50 ngから希少なCTF1mRNAを検出することができました. どちらの場合も, 15分間の露光で十分ターゲットの検出が可能でした. 90分間の露光では, 感度の増加は見られませんでした. したがって, DIGラベルRNAプローブを用いて, トータルRNA中の希少なmRNAを容易に検出することが可能です. ラジオアクティブ・ラベルRNAプローブ(データは示されていません)では, 10 μgを上回る量のトータルRNAからCTF1 mRNAを検出するのにオーバーナイトでの露光が必要でした.

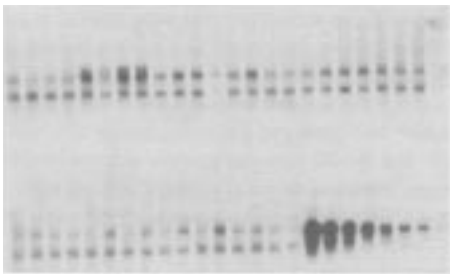


図 16. ノーザンブロット上のNGF由来mRNAとインターナルコントロールRNAとの同時検出. ラット海馬において神経成長因子(NGF)のmRNAの発現をスクリーニングするため, ノーザンブロットスクリーニングシステムを開発した. 精製されたラット海馬由来mRNAを含む試料を, 条件の異なる実験に使用した. 試料はグリオキサルゲルで変性・分離され, ブロッティングメンブレンへトランスファーされた後, 50%フォルムアミドを含むハイブリダイゼーションバッファー中でDIGラベルアンチセンスNGFのRNAプローブを用いてハイブリダイズされた.それぞれの動物個体から等量のmRNAがロードされたことを確認するため, RNA試料は, mRNAの調製前に 5 pg NGF遺伝子のセンス-トランスクリプト(リカバリー用スタンダード)と「スパイク」させた. このインターナルコントロールは, NGFプローブにより常にハイブリダイゼーションシグナルを示めすはずである(各レーン下側のバンド). この操作により, リファレンスの「ハウスキーピング」遺伝子のハイブリダイゼーション反応を行う必要なく, 試料を一貫して一般化させた結果を得ることができる. さらに, ブロットは測定用スタンダードとして *in vitro* 転写された完全長NGFのセンス-トランスクリプトを含む(右 8 レーンの下側). ブロッティングと化学発光検出はDIGシステムの標準的なテクニックにより行われた(データはBastian Hengerer, Ciba Geigy, Switzerlandのご厚意による).
結果：測定用試料から, プローブがわずか0.6 pgのターゲットmRNA中から完全長のNGFのmRNAを検出することができることが示されています(下側レーンの右下).

化学発光法によるブロット上にハイブリダイズしたプローブの検出

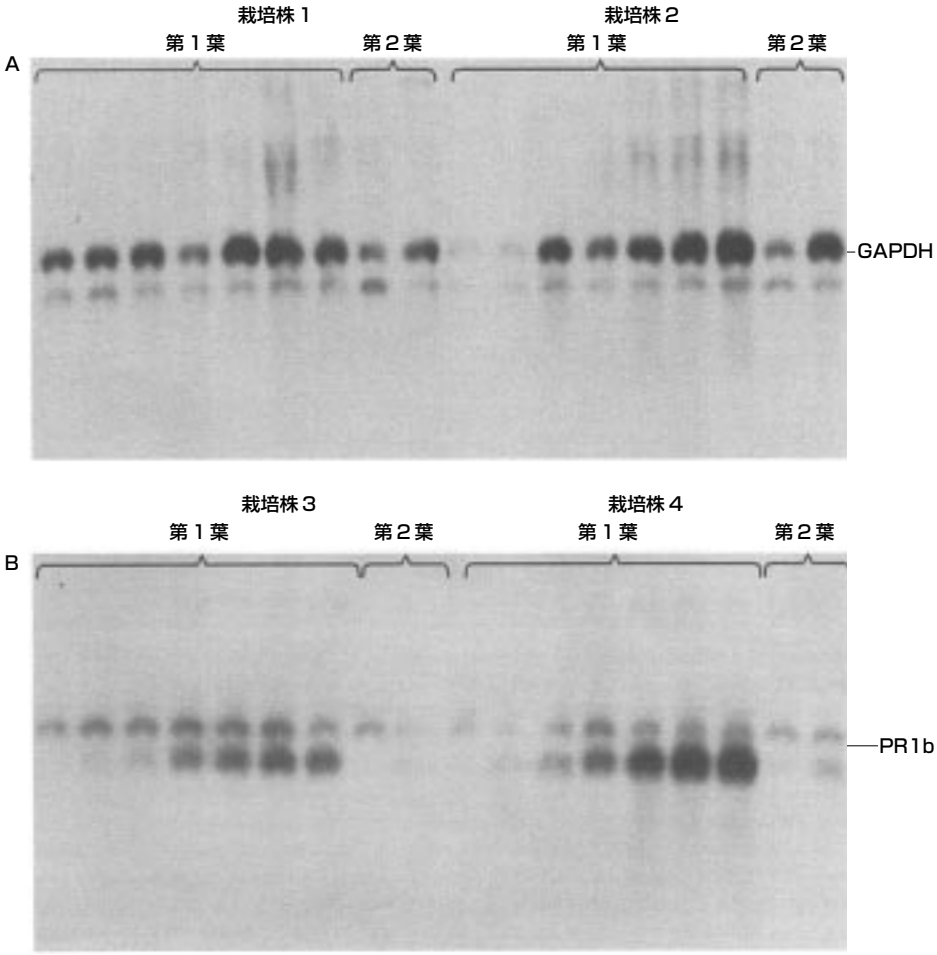


図17. ハイブリダイゼーション間でプローブを剥離せず，２種類のプローブを用いたノーザンブロットの検出.
オオムギの葉の老化期間に蓄積される特別なトランスクリプトの研究には，多くの試料のスクリーニングが必要とされてきた(異なる作物の第１葉と第２葉)．この研究をシンプルにするため，１回のノーザンブロットに２種類のラベルRNAプローブを途中で剥離させるステップなしで用いる方法が考案された．ターゲットとして１μgのトータルRNAが使用された．初めに，DIGラベルアンチセンスRNAプローブ[A]を使用して，コントロールとして確立されたmRNA(GAPDH)の検出を行った．次に，フルオレセインラベルプローブ[B]を使用して，老化の過程で蓄積されるシングルコピー遺伝子(PR1b)の検出を行った．それぞれの実験におけるプローブ濃度は，DIG Easy Hyb 1 ml当たり100 ngとした．標準的なハイブリダイゼーションおよびストリンジェント洗浄を行った．ハイブリッドは，アルカリホスファターゼ標識された抗DIG抗体[A]および抗フルオレセイン抗体を用いて検出された．それぞれのプローブによるシグナルはCDP-*Star* を用いて可視化され，X-線フィルムに10分間露光された(データは，C.Peterhänsel, University of Aachen, Germanyのご厚意による)．
結果および結論：異なるラベル(DIG-UTPとフルオレセイン-UTP)による２種類のプローブを使用することで，途中でプローブを剥離させる必要なくハイブリダイゼーションを続けて行うことが可能になりました．初めの検出に使用された抗DIG抗体は次のハイブリダイゼーションの間に変性されたため，２回目のアッセイを妨げることはありませんでした．両アッセイとも露光に必要な時間は同じ(10分間)であったことから，２回目のアッセイでもプローブの感度の低下は見られませんでした．
ノート: このシステムはラジオアクティブなアッセイに比べて，より迅速かつ高感度です．ラジオアクティブな(^{32}Pラベル)プローブを用いた比較のアッセイ(データは示されていません)では，10 μgのトータルRNAからGAPDHやPR1bのmRNAを検出するのに，X-線フィルムへの露光が36時間必要でした．

4. 2 発色法によるブロット上にハイブリダイズしたプローブの検出

感度の高さとスピードの両面から，多くの研究者がDIGラベルされたプローブとターゲットを可視化させるために，本章のセクション 4.1で解説されている化学発光法を使用しています．しかし，発色検出法が好まれる場合もあります：
以下に発色法の特長を示します：

- **発色法ではシグナルが目に見えるため，フィルムに露光する必要がありません．**
  化学発光のシグナルを記録するために必要となる特別な設備がない場合に有用です．
- **異なる色の基質が手に入ります．**
  2種類以上の基質を組み合わせて，複数ターゲットの検出を行うことが可能です（例として図19を参照）．

ロシュ・ダイアグノスティックス社では，これら発色法に使用するアルカリホスファターゼ発色基質をいくつか発売しています（下表を参照）．

ノート：弊社から発売されている発色基質の全製品リストについては,総合カタログまたはウェブサイト（http://www.roche-applied-science.com）を参照ください．

DIGシステムに使用することができるアルカリホスファターゼの発色基質

製品名	アプリケーション	発色産物[1]	必要となるインキュベーション時間[2]	備　考
NBT/BCIP Stock Solution（Cat. No. 1 681 451） NBT/BCIP Ready-to-use Tablets（Cat. No. 1 697 471）	● サザンブロット，ウェスタンブロット，コロニー/プラークリフト，*in situ* アッセイ	● 青色, 不溶性	5 分間～16時間	●ニトロセルロースおよびナイロンメンブレンの両方に使用可能です． ●ブロットを再び水に漬れば，シグナルの再生が可能です．
HNPP Solution[4]	● サザンブロット，ノーザンブロット，コロニー/プラークリフト	● 赤色, 不溶性	2 時間～16時間	●HNPP Fluorescent Detection Setに含まれる試薬です．

1 これらの基質全てが形成する沈殿物を肉眼で見ることができます．結果をコピーや写真により記録し，永久保存しても良いでしょう．
2 インキュベーション時間は，存在するハイブリッドの量やシグナルの複雑さに大きく依存します．
3 HNPP溶液は単品試薬としては発売されていませんが，HNPP Fluorescent Detection Set（Cat. No. 1 758 888）の一部として発売されています．このセットはELISAのアッセイに使用されますが，セット中のHNPP溶液は単独の発色試薬として使用することができます．

このセクションでは, ブロット上にハイブリダイズしたDIGラベルされたプローブを検出するためのNBT/BCIPの使用操作について詳しく解説します.
このセクションのトピックは以下の通りです：

トピックの情報		ページ
発色検出に必要な材料	⇒	116
操作方法		
● 抗DIGを用いてプローブとターゲットとのハイブリッドの局在をつきとめる	⇒	117
● NBT/BCIPを用いてプローブとターゲットとのハイブリッドを可視化させる	⇒	119
● 次に行うこと	⇒	120
発色検出アッセイを用いた代表的な実験結果	⇒	121

4. 2. 1 発色検出に必要な材料

試　薬	説明および目的
メンブレンの洗浄およびブロッキングバッファー	● DIG Wash and Block Buffer Set（DNase and RNase-free), Cat. No. 1 585 762
アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体	● Cat. No. 1 093 274にて別売されています. ● DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Cat. No. 1 585 614にも含まれています. ● DIG Northern Starter Kit, Cat. No. 2 039 672にも含まれています.
アルカリホスファターゼの発色基質 ●NBT/BCIP	● Cat. No. 1 681 451（溶液）やCat. No. 1 697 471（タブレット）として別売されています（115ページの表を参照）. ● DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, Cat. No. 1 745 832にも含まれています.
検出バッファー	● 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5（20℃）
TEバッファー	● 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 約 8
AP不活性化バッファー	● 50 mM EDTA, pH 8.0（マルチカラー検出のみに必要）

4. 2. 2 操作方法

発色検出の各操作とそれぞれのステージの
所要時間を以下のチャートに示します.

4.2.2.1 （117ページ）	**プローブとターゲット核酸とのハイブリッドの局在を抗DIGによりつきとめる** ステージ A : メンブレンの洗浄とブロッキング ステージ B : 抗DIG抗体を用いプローブとターゲットとのハイブリッドの局在をつきとめる ステージ C : 結合しなかった抗体をメンブレンから洗い流す	35分間 30分間 30分間
4.2.2.2 （119ページ）	ステージD1: NBT/BCIPを用い，プローブとターゲットとのハイブリッドを可視化させる	10〜16時間

4. 2. 2. 1 抗DIG抗体を用いてプローブとターゲット核酸とのハイブリッドの局在を検出する

ノート：

- 特に指示がない限り, 以下のインキュベーションは全て室温にて振とうを加えて行ってください.
- 下記の容量は，10 cm × 10 cm（100 cm^2）のブロットをプラスチック製トレーを用いて処理する場合のものです. 小さめのブロット（コロニー/プラークハイブリダイゼーション用メンブレンディスクなど）を処理する場合や小さめの容器を使用する場合には，容量を少なくすることができます. メンブレンが完全に覆われる十分量の溶液を用い，振とう時にメンブレンが容器にくっつかないように注意してください.

実験を始める前に：まず検出操作に使用する溶液を調製します：

溶　液	組成と調製方法	保存と安定性
マレイン酸バッファー[1]	● 0.1 M マレイン酸, 0.15 M NaCl ; NaOH（固体）を用いてpH 7.5に調整します.	室温で安定.
ブロッキング溶液[1]	● マレイン酸バッファーを用いて, 10×濃度のブロッキング溶液を 1：10に希釈します.	使用時に新たに調製してください.
洗浄バッファー[1]	● 0.1 M マレイン酸, 0.15 M NaCl ; pH 7.5 ; 0.3%（v/v）Tween 20	室温で安定.
抗体溶液[2]	● 使用時ごとに抗ジゴキシゲニン-APをもとのバイアルのまま10000 rpmにて 5 分間遠心し，必要量をバイアルの上清から慎重にピペットで採取します. ブロッキング溶液を用いて，抗ジゴキシゲニン-APを 1：5000（150 mU / ml）に希釈します.	使用時に新たに調製してください. （4℃で 2 時間安定）

発色法によるブロット上にハイブリダイズしたプローブの検出

溶　液	組成と調製方法	保存と安定性
検出バッファー[1]	● 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5（20℃）	室温で安定.
TEバッファー	● 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0	室温で安定.

1 これらの濃縮ストック溶液（10×）は, DIG Wash and Block Buffer Setの一部として発売されています. 特に指示がない限り, 滅菌再蒸留水を用いて10倍に希釈し, 実際に使用する溶液を調製してください. RNAの検出には, DMDC-またはDEPC-処理水を使用してください.
2 発色検出と化学発光検出の操作とでは, 抗体の希釈率が異なることに注意してください.

ステップ	実験操作	時　間
①	● 100 mlの洗浄バッファーが入ったプラスチック容器（トレーなど）にメンブレンを移します. ● 室温にて振とうしながら 2 分間インキュベートします. ● 洗浄バッファーを捨てます.	2 分間
②	● 100 mlのブロッキング溶液をトレーに加えます. ● メンブレンを振とうしながら30分間インキュベートします. *Tip：*このブロッキングのステップは, 3時間まで延長させることが可能です. 結果への影響はありません. ● ブロッキング溶液を捨てます.	30分間
③	● 20 mlの抗体溶液をトレーに加えます. ● 振とうしながら, メンブレンを30分間インキュベートします. ● 抗体溶液を捨てます.	30分間
④	100 ml量の洗浄バッファーで, メンブレンを15分間×2回洗浄します.	2×15分間
⑤	20 mlの検出バッファーでメンブレンを 3 分間平衡化させます.	3 分間
⑥	操作 4.2.2.2に進んでください.	

4. 2. 2. 2 NBT/BCIPを用いてプローブとターゲット核酸とのハイブリッドを可視化させる

ステップ	実験操作		時　間
①	以下のいずれかの方法で，発色基質溶液を調製します:		1～3分間
	使用する基質	**調製方法**	
	NBT/BCIP ストック溶液（Cat. No. 1 681 451）	10 ml の検出バッファーに200 µl のNBT/BCIPストック溶液を加え，発色基質溶液[1]を調製します.	
	NBT/BCIP タブレット（Cat. No. 1 697 471）	10 ml の滅菌再蒸留水にNBT/BCIPタブレットを完全に溶解させ，発色基質溶液[1]を調製します.	
	1 発色基質溶液を遮光保存してください.		
②	● メンブレン **1枚**当たり10 ml の発色基質溶液で，メンブレンを完全に覆ってください. ***ノート：***複数のメンブレンを処理する場合は，一枚ずつ操作を行ってください. ● メンブレンを遮光した状態で，**振とうせずに**インキュベートしてください. ***ノート：***数分以内に発色沈殿が生じます. 反応は通常16時間後に終了します.		16時間
③	発色反応により希望する強度のバンドが得られたら，50 ml のTEバッファー中でメンブレンを5分間洗って，反応を停止させてください.		5分間
④	セクション 4.2.2.4の「次に行うこと」を参照ください.		

4. 2. 2. 4 次に行うこと

何をしたいか		どうすればよいか，また，本書のどこを見ればよいか
NBT/BCIPを用いて得られた結果（操作 4.2.2.2）を記録し，メンブレンを保存したい.	⇒	● 湿った状態のメンブレンをコピーするか，写真撮影してください. ● 室温でメンブレンを乾燥させ，そのまま乾燥したメンブレンを室温で保存してください. ***ノート：***リプロービングをする場合は，メンブレンを乾燥させずに，TEバッファー中で保存してください（下記参照）. 乾燥したメンブレン上では，発色が減衰することがありますが，TEバッファーに浸すと，発色を再生させることが可能です.
メンブレンからプローブを剥離し，他のプローブとハイブリダイズさせたい.	⇒	● プローブの剥離を行うまで，メンブレンをTEバッファー中で保存します. ● 本章の122ページ，セクション 5の「メンブレン上のプローブの剥離とリプロービングのテクニック」へ進んでください.
発色検出法により得られた代表的な実験結果を見たい.	⇒	● 次のセクション 4.2.3を参照ください.

4. 2. 3 発色検出アッセイを用いた代表的な実験結果

図 18. ヒトbuffy coat DNAにおけるN-RASの検出.
様々な量のヒト血液DNAのbuffy coatフラクション由来のトータルDNAをゲルで分離し，メンブレンへブロットトランスファーした．ブロットをPCRラベルされたシングルコピーN-RASの遺伝子を認識するプローブとハイブリダイズさせた．プローブとターゲットとのハイブリッドを標準的なDIG発色検出アッセイにより可視化させた．それぞれの試料中のDNAの全容量をブロットのレーン下に示した．レーン 1は，DIGラベルされたDNA分子量マーカーである．
結果：PCRにより調製されたDIGラベルプローブは，サザンブロット上のヒトbuffy coatDNAの全量わずか0.25 μgの中からシングルコピーN-RASの遺伝子を検出することができました．

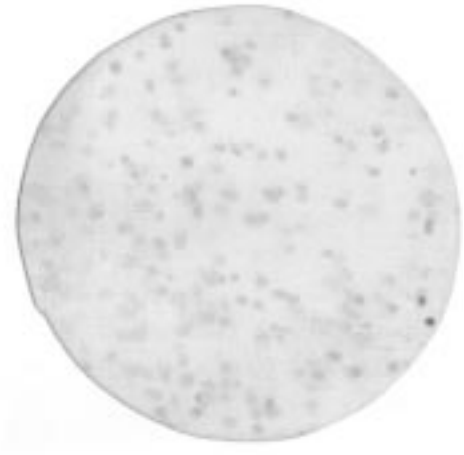


図19. 3 種類の異なるプローブとレインボーディテクションを用いた同時ハイブリダイゼーションによるプラークスクリーニング. それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子（M13::amp^r, M13::neo^r, M13::tet^r）を持つ 3 種類のファージクローンを 1 : 1 : 1 の比で混合し，同じプレート上に播いた．プラークハイブリダイゼーションには，DIGラベルされたAmp^r プローブ，フルオレセインラベルされたNeo^r プローブ，ビオチンラベルされたTet^r プローブの3種類の混合試薬（各25 ng/ml）が用いられた．プローブとプラークとのハイブリッドを可視化させるため，Multicolor Detection Setの発色基質を用い，3 通りの検出を行った：
1 番目の検出：アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体（抗DIG-AP）と「青色」のAP基質を用いてAmp^r 遺伝子を検出した．検出後にプレートを50 mM EDTA中で85℃にて30分間加熱し，APを不活性化させた．
2 番目の検出：抗フルオレセイン-APと「緑色」のAP基質を用いてNeo^r 遺伝子を検出した．
検出後，1 番目と同じ方法でAPを不活性化させた．
3 番目の検出：ストレプトアビジン-APと「赤色」のAP基質を用いてTet^r 遺伝子を検出した．
それぞれの検出で発色を展開させるためのインキュベーション反応を約1.5時間行った．
結果と結論：プレート上で 3 種類のファージ由来のクローンが明瞭に可視化されています．Multicolor Detection Setを用いたレインボーディテクションのテクニックにより 3 種類の異なるクローンの同時検出が可能であるため，ライブラリースクリーニングの能率を上げることが可能です．
※ カラー原図は，インターネットでご覧ください．
（**http://roche-applid-science.com/PROD_INF/MANUALS/DIG_MAN/dig120-136.pdf**）

5. メンブレン上のプローブの剥離とリプロービングのテクニック

メンブレンからプローブをはがす(剥離する)ことで，別のプローブを用いて次のターゲットを検出することが可能です．

このセクションでは，プローブの剥離とリプロービングの操作について解説します．

トピックの情報		ページ
プローブの剥離とリプロービングに必要な材料	⇒	122
操作方法：		
● 化学発光検出した後にDIGラベルされたDNAプローブを剥離する	⇒	123
● NBT/BCIPを用いて発色検出した後にDIGラベルされたDNAプローブを剥離する	⇒	124
● 化学発光検出した後にDIGラベルされたRNAプローブを剥離する	⇒	124
● 次に行うこと	⇒	125

5. 1 プローブを剥離させる反応に必要な材料

試　薬 / 設　備	説明および目的
検出アッセイ後，メンブレンからDIGラベルDNAプローブを剥離させるために必要なもの	
剥離用バッファー	● 0.2 M NaOH, 0.1% SDS
2×SSC	● 0.3 M NaCl, 30 mM Sodium citrate, pH 7.0
NBT/BCIPを用いた発色検出アッセイ後，メンブレンを脱色するために必要なもの	
換気フード	● 脱色のインキュベーション用
ジメチルフォルムアミド	● NBT/BCIP産物を溶解させるために使用します．
大きめのビーカー	● ジメチルフォルムアミドを温めるために使用します．
加熱用プレート	● ジメチルフォルムアミドを温めるために使用します．
化学発光検出アッセイ後，メンブレンからDIGラベルRNAプローブを剥離させるために必要なもの	
剥離用バッファー	● 50% 脱イオン化されたフォルムアミド; 5 % SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 7.5
2×SSC	● 0.3 M NaCl, 30 mM Sodium citrate, pH 7.0

5. 2 操作方法

プレハイブリダイゼーション, ハイブリダイゼーションあるいは検出の操作のいずれかのステージでメンブレンを乾燥させると, メンブレンからプローブを剥離してリプロービングさせることはできません. プローブ剥離の各操作とそれぞれのステージの所要時間を以下のチャートに示します：

剥離するプローブのタイプ	剥離する前の検出アッセイのタイプ	剥離に必要な時間
DIGラベルDNAプローブ	化学発光検出	30〜40分間
DIGラベルDNAプローブ	発色検出	約 2 時間
DIGラベルRNAプローブ	化学発光検出	1〜2 時間

5. 2. 1 化学発光検出した後にDIGラベルされたDNAプローブを剥離する

Tip：この操作におけるアルカリ洗浄は, ほとんどのDIGラベリングキット内に供給されているアルカリ感受性DIG-dUTPを用いて調製されたプローブを剥離します.

実験操作	使用する溶液	時　間
1. メンブレンをよく洗います.	再蒸留水	1 分間
2. メンブレンを剥離用バッファーで37℃にて 2 回洗浄します.	0.2 M NaOH, 0.1% SDS	15分間 × 2 回
3. メンブレンを洗います.	2 × SSC	5 分間

5. 2. 2 NBT/BCIPを用いて発色検出した後にDIGラベルされたDNAプローブを剥離する

実験操作	使用する溶液	時　間
1. 換気フードの中で，ジメチルフォルムアミドの入った大きめのビーカーを50℃～60℃に温めます.	ジメチルフォルムアミド	―
2. メンブレンを温めたジメチルフォルムアミド中に入れ，50℃～60℃で青い色がメンブレンから消えるまでインキュベートします[1].	―	1 時間
3. メンブレンをよく洗います.	再蒸留水	1 分間
4. メンブレンを剥離用バッファーで37℃にて2 回洗浄します.	0.2 M NaOH，0.1% SDS	20分間×2 回
5. メンブレンを洗います.	2 × SSC	5 分間

1 DMF（ジメチルフォルムアミド）を途中で交換すると，操作をスピードアップすることができます.

5. 2. 3 化学発光検出した後にDIGラベルされたRNAプローブを剥離する

ノート：常に剥離用バッファーは，使用する直前に調製してください. 弊社のアプリケーション・ラボでは，以下の操作によりノーザンブロットのプローブ剥離とリプロービングを最大24回まで成功させています.

実験操作	使用する溶液	時　間
1. メンブレンをよく洗います.	再蒸留水	―
2. メンブレンを剥離用バッファーで80℃にて2 回洗浄します.	50% 脱イオン化フォルムアミド，5% SDS，50 mM Tris-HCl, pH 7.5	60分間×2 回
3. メンブレンを洗います.	2 × SSC	5 分間

5. 2. 4 次に行うこと

何をしたいか		どうすればよいか，また，本書のどこを見ればよいか
DIGラベルされた別のプローブを用いてメンブレンをリプロービングしたい	⇒	DIGラベルされた別のプローブを用いて，ハイブリダイゼーションと検出の操作を繰り返してください． ***ノート：***保存されたハイブリダイゼーション溶液を再使用する場合は，溶液を68℃で10分間温め，プローブを変性させてからハイブリダイゼーションに使用してください．
プローブを剥離したメンブレンを，次回使用するまで保存したい	⇒	メンブレンを 2×SSC中に浸したまま保存してください．

6. DIGラベルされたプローブの大容量スクリーニング・アプリケーション

本章のセクション 3 では，DIGラベルされたプローブを使用して 1 枚のブロット上のターゲット核酸を見いだす方法について解説がなされています．このセクションでは，DIGラベルされたプローブを使用して大量の試料中から少数のターゲット核酸を検出する方法について解説します．このセクションで解説される大容量法は，ジェノミックまたはcDNAライブラリーのスクリーニングなどに利用することができます．
このセクションのトピックは以下の通りです：

トピックの情報		セクション	ページ
DIGラベルされたプローブをコロニー / プラークハイブリダイゼーションに使用する	⇒	6.1	126

6. 1 DIGラベルされたプローブをコロニー /プラークハイブリダイゼーションに使用する

このセクションでは，DIGラベルされたDNAハイブリダイゼーションプローブを細菌コロニーやファージプラークの相補的な(リコンビナント)シークェンスのスクリーニングに使用するための方法について解説します. このセクションのトピックは以下の通りです：

トピックの情報		ページ
コロニー / プラークハイブリダイゼーションに必要な材料	⇒	126
操作方法：		
●コロニーまたはプラークリフトの調製	⇒	129
●DIGラベルされたDNAプローブをコロニー/プラークリフトにハイブリダイズさせる	⇒	132
●化学発光アッセイを用いたプローブとターゲットDNAとのハイブリッドの検出[トランスパランシー(Transparency)法]	⇒	133
●発色アッセイを用いたプローブとターゲットDNAとのハイブリッドの検出	⇒	134
コロニー / プラークハイブリダイゼーションに関する大切なヒント	⇒	134
DIGラベルされたプローブを用いたコロニー / プラークのスクリーニングにおける代表的な実験結果	⇒	135

6. 1. 1 コロニー/プラークハイブリダイゼーションに必要な材料

スクリーニングのプロトコールを完了させるには, 以下の設備, 材料および試薬が必要です. 多くはロシュ・ダイアグノスティックス社から発売されています(以下にカタログ番号を記します).

試　薬 / 設　備	カタログ番号	説明および用途
コロニーまたはプラークリフトに必要なもの		
アガープレート		● コロニー / プラークのディスプレー / 支持体として使用します. ***ノート：*** プラークには, YTブロス中にて0.7%アガロースMP(Cat. No. 1 444 964)に調製したトップアガーの使用をお薦めします.
コロニー / プラークハイブリダイゼーション用ナイロンメンブレン	1 699 075（82 mmディスク） 1 699 083（132 mmディスク）	● マイクロ多孔, 親水性のチャージのないナイロンメンブレン.
プラスチック製フィルム		● 操作に使用する溶液をメンブレンに均一に広がるように用います.
変性溶液		● 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
中和溶液		● 1.5 M NaCl, 1.0 M Tris-HCl, pH 7.4（21℃）
2 × SSC		● 0.3 M NaCl, 30 mM Sodium citrate, pH 7.0 ; 20 × SSC(Cat. No. 1 666 681)の10倍希釈液
3MM紙（Whatman）		● ナイロンメンブレンのブロッティングに使用します.
UVトランスイルミネーターまたはUVクロスリンカー		● DNAをナイロンメンブレンに固定させるために使用します.

試　薬 / 設　備	カタログ番号	説明および用途
細胞のデブリスなどを取り除くために必要なもの（コロニーリフトのみ）		
プロティナーゼ K 溶液, 分子生物学用グレード, >600 U / ml	3 115 887（1.25 ml） 3 115 828（5 ml） 3 115 844（25 ml）	● 酵素溶液, 10 × 濃度, DNaseフリー
37℃設定のインキュベーター		● プロティナーゼ Kのインキュベーションに使用します.
DIGラベルされたプローブを用いたコロニー/プラークリフトのスクリーニングに必要なもの		
DIGラベルされたDNAプローブ, コロニー / プラークリフト中から 検出するシークェンスと相補的なもの		● DIGラベルDNAプローブは，ランダムプライムドラベリング, PCR, あるいはその他の方法により調製することができます. プローブの調製には，PCRラベリング法の使用を お薦めします（本章の51ページ，セクション 2.2にて解説）.
沸騰したウォーターバス		● プローブの熱変性に使用します.
DIG Easy Hyb	1 603 558	● Ready-to-useのハイブリダイゼーションバッファー.
275 ml 容量のローラーボトル または密閉可能なバッグ		● プレハイブリダイゼーション / ハイブリダイゼーションの インキュベーションに使用します. ***ノート：***DIG Easy Hybのインキュベーションには，ふたの ない容器を使用しないでください.
42℃に設定したローラーボトル インキュベーターオーブン		● プレハイブリダイゼーション / ハイブリダイゼーションの インキュベーションに使用します.
低ストリンジェンシー洗浄 バッファー		● 2 × SSC, 0.1% SDS
高ストリンジェンシー洗浄 バッファー		● 0.5 × SSC, 0.1% SDS
プローブとターゲットとのハイブリッドの免疫化学検出に必要なもの		
DIG Wash and Block Buffer Set （DNase- and RNase-free）	1 585 762	● 洗浄バッファー, 10 × 濃度 ● マレイン酸バッファー,10 × 濃度,ブロッキング溶液の希釈用. ● ブロッキング溶液, 10 × 濃度 ● 検出バッファー, 10 × 濃度
アルカリホスファターゼ（AP）標識 抗DIG抗体	1 093 274	● ポリクローナル抗体，Fabフラグメント. プローブとターゲットとのハイブリッドの中のDIGを 検出するために使用します.
ハイブリダイゼーションバッグ	1 666 649	● 蛇口付きプラスチック製バッグ（25 × 24 cm）. 蛇口はバッファー溶液の交換に便利です.

試　薬 / 設　備	カタログ番号	説明および用途
化学発光による可視化に必要なもの		
化学発光AP基質- 以下のいずれかを選択してください：		
● CSPD, 25 mM	1 655 884（1 ml） 1 759 035（2 × 1 ml） 1 759 043（4 × 1 ml）	● 100 × 濃度
● CSPD, ready-to-use, 0.25 mM	1 755 633（2 × 50ml）	● 1 × 濃度
● CDP-*Star*, 25 mM	1 685 627（1 ml） 1 759 051（2 × 1 ml）	● 200〜500 × 濃度
● CDP-*Star*, ready-to-use, 0.25 mM	2 041 677（2 × 50 ml）	● 2 〜 5 × 濃度
化学発光を記録するシステム -		
● Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	1 666 657（20.3 × 25.4 cm） 1 666 916（18 × 24 cm）	● 化学発光の可視化のために最適化されたX-線フィルム.
3MM紙（Whatman）		● メンブレンから余分な溶液を取り除くために使用します.
発色による可視化に必要なもの		
発色AP基質- 以下のいずれかを選択してください：		
● NBT / BCIP		
● NBT溶液	1 383 213	● 70%ジメチルフォルムアミド中に 4 -ニトロブルーテトラゾリウムクロライドを 100 mg / ml にて溶解させたもの.
● BCIP溶液	1 383 221	● ジメチルフォルムアミド中に 5 -ブロモ- 4 -クロロ- 3 -インドリルリン酸（BCIP）を50 mg / mlにて溶解させたもの.
● NBT/BCIP Stock Solution	1 681 451	● 67% DMSO（v/v）中に NBT 18.75 mg / ml および BCIP 9.4 mg / mlにて溶解されたもの.
TEバッファー		● 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 ; 発色反応停止用バッファーとして使用します.

6. 1. 2 操作方法

コロニーおよびプラークスクリーニングの　フローチャートに示されます.
それぞれの操作および所要時間は, 以下の

6.1.2.1 （129ページ）	**コロニーまたはプラークリフトの調製**	1 ～ 2.5時間
	▼	
6.1.2.2 （132ページ）	**DIGラベルDNAプローブを コロニー/プラークリフトにハイブリダイズさせる**	3.75時間
	▼	
6.1.2.3 （133ページ）	**プローブとターゲットとのハイブリッドを, 化学発光または発色アッセイにより検出する** ステージ A：メンブレンの洗浄とブロッキング ステージ B：抗DIG抗体を用いてプローブとターゲットとのハイブリッドの局在をつきとめる ステージ C：メンブレンの洗浄	 35分間 30分間 30分間
	▼	
6.1.2.3 （133ページ）	ステージ D1：CSPDを用いてブロット上のDIGを検出する	30～50分間
	または	
	ステージ D2：CDP-*Star* を用いてブロット上のDIGを検出する	5 ～25分間
	または	
6.1.2.4 （134ページ）	ステージ D3：NBT/BCIPを用いてブロット上のDIGを検出する	10 ～ 16時間

6. 1. 2. 1 コロニーまたはプラークリフトの調製

ステップ	実験操作	時　間
①	コロニーやプラークを含むアガープレートを, 4℃で約30分間冷却します. ***ノート：***プラークリフトのトップアガー（YT培養液中にて0.7%）には, 弊社のアガロースMPを使用することをお薦めします.	30分間
②	プレートを冷却させている間に, 以下の操作を行います： ● 実験台の上にプラスチック製の薄いフィルムシート（プラスチックフォイルともいいます）を敷きます. 処理するメンブレンのサイズや枚数に応じて, シートの大きさを調節してください. ***ノート：***しわになるので, サランラップなどを使用しないでください. ● それぞれのメンブレンディスク用に,プラスチック製フィルム上に変性溶液（0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl）の溶液だまり（puddle）1 ml（132 mm ディスクには 2 ml ）を乗せます. ***ノート：***変性溶液の溶液だまり（puddle）どうしが混ざりあって流れないよう, 滴と滴との間に十分なスペースを作ってください. ● 乾燥したWhatman 3MM紙のシートを 3 枚切り出します.	―

ステップ	実験操作	時　間
③	● あらかじめ冷却した各プレートの表面に，メンブレンディスクを 1 枚ずつ乗せていきます. メンブレンとアガーとの間に気泡が入らないよう注意して操作を行ってください. ***ノート：***メンブレンをいったんプレート上に設置したら, メンブレンを動かさないでください. ● メンブレンをプレート上で約 1 分間そのままにしてください. ***ノート：***プレート上のポジティブなプラークまたはコロニーの識別を可能にするため，メンブレンに印を付け, 各プレートに対するメンブレンの設置方向や位置が明らかであることを確認してください. ***Tip：***1 枚のプレートから反復してリフトを写す場合，2 回目のメンブレンについてはプレート上に 2 分間（1 枚目よりも長く）設置して，プレート上のコロニー / プラーク数の減少に対して効果的なトランスファーがなされるようにしてください.	2 分間
④	メンブレンフィルター用の小型ピンセットなどを利用して，以下の操作を行ってください： ● それぞれのメンブレンディスクをプレートからはがします. ● メンブレンディスクをひっくり返し，コロニー / プラークのパターンがある面を上にして乾燥したWhatman 3MM紙の上に乗せ, メンブレンの下面の水分を手短にブロットします. ● プラスチックフィルム上の変性溶液のそれぞれの溶液だまり（puddle）（ステップ 2）の上に，メンブレンを 1 枚ずつ（コロニー / プラーク面が上になるように）慎重にそっと乗せます. メンブレンに溶液が完全に均一にゆきわたっていることを確認してください. ***ノート：***溶液だまり（puddle）にメンブレンディスクの端が当たるようにすると, 溶液がディスク全体に広がります. ディスクの中央を溶液だまり（puddle）に当てると，溶液がディスクに均一に広がりにくくなります.	1 分間
⑤	ディスクを以下の通りインキュベートします： ● プラークでは 5 分間 ***ノート：***プラークでは 5 分間より長くインキュベートしないでください. ● コロニーでは15分間 ***ノート：***コロニーでは, 常に15分間しっかりとインキュベートしてください.	5 ～15 分間
⑥	インキュベーションの最後の 2 ～ 3 分の間に, 新しいプラスチックフィルムを用意し, 中和溶液（1.5 M NaCl, 1.0 M Tris-HCl，pH 7.4）の溶液だまり（puddle）1 ml（132 mmのディスクでは 2 ml）を乗せます.	―
⑦	インキュベーションが完了したら，メンブレンを新しい乾燥した Whatman 3MM紙の上に置き手短に風乾させます.	1 分間
⑧	● 使用済みのプラスチックフィルムを捨てます. ● ディスクを,（ステップ 4 の要領で）中和溶液を乗せた新しいプラスチックフィルムに移します. ● 5 ～15分間（ステップ 5 の要領で）インキュベートします.	5 ～15 分間
⑨	インキュベーションの最後の 2 ～ 3 分の間に,新しいプラスチックフィルムを用意し,2×SSCの溶液だまり（puddle）1 ml（132 mmのディスクでは 2 ml）を乗せます.	―
⑩	インキュベーションが完了したら，風乾のステップ（ステップ 7）を繰り返します.	1 分間
⑪	● 使用済みのプラスチックフィルムを捨てます. ● ディスクを,（ステップ 4 の要領で）2×SSCを乗せた新しいプラスチックフィルムに移します. ● 10分間インキュベートします.	10分間

ステップ	実験操作	時　間
⑫	ディスクに15 cmの距離からUV光を約30秒～5 分間照射し,トランスファーされたDNAをディスクに架橋固定（クロスリンク）させます. ***ノート：***UVクロスリンクの代わりに，メンブレン上のDNAをベークする（80℃で少なくとも30分間）ことも可能です. ***Tip：***弊社ではDNAの固定にUV Stratalinker を（120 mJにて）使用しています．UVトランスイルミネーターを使用することも可能ですが，照射時間を経験的に決定しておく必要があります．一般的に，短波長のUVでは 1 分またはそれより短い時間で架橋固定が可能です．長波長のUVでは２～３分間照射してみてください. 照射時間を 5 分間まで必要とするトランスイルミネーターもあります.	30秒～5 分間
⑬	以下のいずれかの操作へ進んでください： **調製したリフト** ／ **次のステップ** プラークリフト ／ 操作 6.1.2.2 （ハイブリダイゼーション）へ進んでください．メンブレンの前処理は必要ありません. コロニーリフト ／ 下記のステップ 14へ進んでください.	
⑭	細胞のデブリスを取り除くため（コロニーリフトのみ），以下の方法によりメンブレンをプロティナーゼ Kで処理します： ● プロティナーゼK（> 600 U/ml, 14～22 mg/ml）を 2 × SSCにて 1 : 10に希釈します. ● アルミホイルまたはプラスチックフィルムを正方形に切ったものの上にメンブレンディスクを置きます. ● 82 mmのメンブレンディスク当たり0.5 mlの希釈したプロティナーゼ K溶液をディスク上にピペットで滴下します. ***ノート：***132 mmのディスクには1.0 mlの希釈したプロティナーゼ K溶液を使用してください. ● 溶液をディスク上に均一に広げ，37℃で 1 時間インキュベートします．インキュベーターの換気装置が停止していることを確認してください. ● Whatman 3MM紙を滅菌水で湿らせて, メンブレンディスクの上に 1 枚ずつ乗せます. ● 定規などを使って, ディスク上のWhatman 3MM紙を強く押さえます. ● Whatman 3MM紙をそっと持ち上げ，ディスクから外します. ***ノート：***持ち上げたWhatman 3MM紙にコロニーのデブリスが全て付着しているはずです．デブリスがディスクにまだ残っているようであれば，新しいWhatman 3MM紙を湿らせて，同じ操作を繰り返してください. ● 全てのデブリスを取り除いたら，操作 6.1.2.2へ進んでください.	1.25時間

6. 1. 2. 2 DIGラベルされたDNAプローブをコロニー/プラークリフトにハイブリダイズさせる

操作を始める前に： 以下の操作を始める前に，プローブとターゲットとの特性に応じた適切なハイブリダイゼーション温度を決定します．ハイブリダイゼーションバッファーとしてDIG Easy Hybを使用する場合，T_{hyb}は以下の計算式で求められます．

- ハイブリッドのT_m = 49.82 + 0.41(%G + C) −(600/L)［%G + C = ラベルされたプローブのGC含量，L = プローブとターゲットとのハイブリッドの長さ(bp)］
- T_{hyb} = ハイブリッドのT_mより20℃〜25℃低い温度［T_{hyb} = 最適なハイブリダイゼーション温度(DIG Easy Hyb中にて)］

ノート： 異なるハイブリダイゼーションバッファーを使用する場合は，付録Aの指示を参考にT_{hyb}を計算してください．

- ***例：*** DIG Easy Hybをハイブリダイゼーションバッファーとし，ターゲットのGC含量が50%で，プローブとターゲットDNAとのホモロジーが100%である場合，使用するT_{hyb}は42℃です．

ノート： コンタミネーションやバックグラウンドを避けるため，必ず手袋を着用し，フィルター用のピンセットを使用してメンブレンディスクを取り扱ってください．

操　作[1]	操作に必要な溶液[1]	時　間
1. 20枚までのメンブレンディスク(直径82 mm)を，275 ml のローラーボトルまたは密封式のハイブリダイゼーションバッグに入れます．	ー	1 分間
2. 密閉された容器中で，メンブレンをハイブリダイゼーション温度(通常42℃)にてプレハイブリダイゼーションさせます．	60 mlのDIG Easy Hyb	1 時間
3. ラベルされたプローブ(25 ng / ml)を，95〜100℃，5分間ボイリングさせて熱変性し，氷上で急冷させます．		5 分間
4. 密閉された容器中で，ハイブリダイゼーション温度にてDIGラベルされたDNAプローブをメンブレンにハイブリダイズさせます．	● メンブレン 1 〜 3 枚の場合：25 ng / ml のDIGラベルDNAプローブを含むDIG Easy Hybを 6 ml ● メンブレン 4 〜20枚の場合：25 ng / ml のDIGラベルDNAプローブを含むDIG Easy Hybを10〜15 ml	2 時間
5. 低ストリンジェント洗浄バッファーを用い，室温でメンブレンを2回洗浄します．	2 × SSC，0.1% SDS	5 分間 × 2 回
6. 高ストリンジェント洗浄バッファーを用い，68℃でメンブレンを2回洗浄します．	0.5 × SSC，0.1% SDS **ノート：***E.coli* 由来DNAでは，68℃にて0.1 × SSC，0.1 % SDSを使用してください．	15分間 × 2 回

1 このステップの操作と溶液について，詳しくは本章の84ページ，セクション 3 .1を参照ください。

6. 1. 2. 3 化学発光アッセイを用いたプローブとターゲットDNAとのハイブリッドの検出[トランスパランシー(Transparency)法]

操　作[1]	操作に必要な溶液[1]	時　間
1. メンブレンを手短に洗浄します.	洗浄バッファー	1～5分間
2. メンブレンをブロッキングします[2].	40 ml ブロッキング溶液	30分間
3. メンブレン上のDIGラベルに抗体を結合させます.	15 mlの希釈済み(1：10000)抗体溶液	30分間
4. メンブレンを2回洗浄し，結合しなかった抗体を洗い流します.	1回の洗浄につき，40 mlの洗浄バッファー	15分間×2回
5. メンブレンを平衡化させます.	20 mlの検出バッファー	2～5分間
6. トランスパランシープラスチックフィルムの上にメンブレンを設置します.[3]	―	―
7. 検出バッファーで化学発光基質を希釈した溶液を，メンブレンに覆いかけます.	メンブレン100 cm^2当たり，以下のいずれかの基質溶液500 μlを使用します： ● 25 mM CSPDストック溶液を1：100に希釈した溶液. ● 0.25 mM CSPD, ready-to-use溶液．希釈せず使用. ● 25 mM CDP-*Star* ストック溶液を1：200～1：500に希釈した溶液. ● 0.25 mM CDP-*Star*, ready-to-use溶液を1：2～1：5に希釈した溶液.	5 分間
8. 溶液で湿ったメンブレンを，トランスパランシーフィルムのもう一方のシートでカバーし，溶液をメンブレン全体にゆきわたらせます.	―	―
9. 5 分間インキュベートします.	CSPDまたはCDP-*Star*	5 分間
10. メンブレンから過剰な溶液を滴下して除去し，トランスパランシーフィルムに湿ったメンブレンをはさんだ状態で，メンブレンの周囲をシールします.	CSPDまたはCDP-*Star*	1 分間
11.（オプション）37℃でCSPDを活性化させます.	CSPDのみ(CDP-*Star* を使用する場合，必要ありません.)	(10分間)
12. メンブレンをシールしたバッグごと，X-線フィルムまたはイメージャーに露光させます.[4]	―	5～25分間

1 これらのステップの操作と溶液について，詳しくは本章の106ページ，セクション 4.1を参照ください.
2 ステップ2～5に示される溶液量は，82 mmのメンブレンディスクを小さめのガラス製トレー内で処理するための適量です. 132 mmのディスクに対しては，それぞれのステップの容量を2倍にしてください. また，複数のディスクを処理する場合は，それらのディスクが完全に溶液に浸り，かつお互いに付着し合わない程度に溶液を増量してください.
3 このトランスパランシー法(transparency technique)(ステップ 6～12にて説明)では，化学発光基質を節約して使用します. 化学発光基質の量を2倍にする場合は，ハイブリダイゼーションバッグ中でこれらのステップを行うことも可能です.
4 メンブレンを長期保存する場合は，プローブを剥離し，2× SSCで湿らせた状態で保存してください(詳しくは本書の122ページ，セクション 5を参照ください).

6. 1. 2. 4 発色アッセイを用いたプローブとターゲットDNAとのハイブリッドの検出

操　作[1]	操作に必要な溶液[1, 2]	時　間
上記の操作 6.1.2.3のステップ 1 ～ 5 を行います.	133ページ，操作 6.1.2.3を参照ください.	93～100分間
6. 発色基質の希釈溶液をメンブレンが完全に浸るように覆いかけます.	以下のいずれかの基質溶液 4 ml を使用します： ● 検出バッファーを用いて新たに調製したNBT / BCIP溶液[3].	1 分間
7. ハイブリダイゼーションのシグナルが必要な強度になるまで, 遮光してインキュベートします. ***ノート：***インキュベーション中は，ディスクを動かしたり揺らしたりしないでください.	● NBT/BCIP（N/X）	10～16時間
8. メンブレンをTEバッファー中でインキュベートし, 反応を停止させます.	50 ml TEバッファー	5 分間
9. 湿った状態のままメンブレンを複写したり，写真に撮影するなどして，結果を記録します[4].	―	―

1 これらのステップの操作と溶液について，詳しくは本章の115ページ，セクション 4.2を参照ください.
2 溶液量は，82 mmのメンブレンディスクを小さめのガラス製トレー内で処理するための適量です.
132 mmのディスクに対しては，それぞれのステップの容量を 2 倍にしてください.
また，複数のディスクを処理する場合は，それらのディスクが完全に溶液に浸り，かつお互いに付着し合わない程度に溶液を増量してください.
3 10 mlの検出バッファー中に，34 μlのNBT溶液（100 mg / ml）と35 μlのBCIP溶液（50 mg / ml）を混合します.
4 メンブレンを長期保存する場合は，プローブを剥離し，2 × SSCで湿らせた状態で保存してください（詳しくは本書の122ページ，セクション5を参照ください）. また，別法としてメンブレンディスクを80℃でベークし，乾燥させた状態で室温保存してください. 発色が減衰した場合は，TEバッファーに再度浸してください（NBT / BCIPの場合のみ）.

6. 1. 3 コロニー/プラークハイブリダイゼーションに関する大切なヒント

操作のファクター	ヒント
メンブレンの選択	DIGシステムを用いて最良の結果を得るためには，特別に開発されたNylon Membranes for Colony and Plaque Hybridizationを使用してください. このメンブレンディスクの特長は以下の通りです： ● あらかじめ湿らせておく必要がないため，操作時間が短縮されます. ● 孔径が 1.2 μmであるため,DNAの迅速かつ定量的なトランスファーと結合が可能です. ● 物理的に頑丈で，DNAの結合能力が高いため，異なるプローブで何回も剥離とリプロービングを反復することが可能です.

操作のファクター	ヒント
コロニーの変性	細菌コロニーを15分間十分に変性させ, 細胞を完全に溶解させてください.
プラークの変性	プラークリフトでは, 変性時間を 5 分に留めてください. 変性時間を長くすると, プラークの周囲の細菌まで溶解させ, 高いバックグラウンドを生じます.
コロニー細胞のデブリスの除去	● プロティナーゼK処理の間, メンブレンを絶対に乾燥させないでください. 例えば, 換気扇のあるインキュベーターを使用してこのステップを行う場合は, 換気扇のスイッチをオフにしてください. 換気扇はメンブレンを短時間で乾燥させます. 乾燥したメンブレン上では, プロティナーゼKは活性を示しません. ● デブリスが除去されないと, 抗DIG抗体がデブリス中の変性タンパクに非特異的に結合し, コロニーの陽性か陰性かの区別が困難になります.

6. 1. 4 DIGラベルされたプローブを用いたコロニー/プラークスクリーニングにおける代表的な実験結果

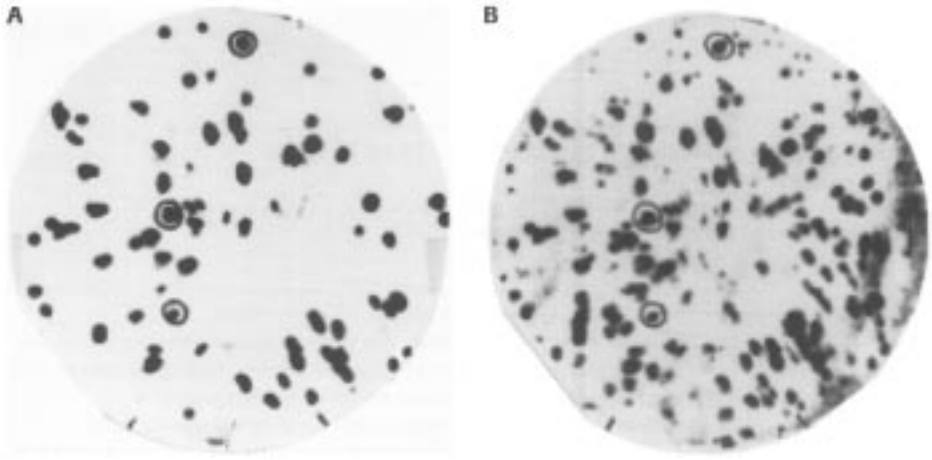


図 20. 異なる 2 種類のプローブの同時使用によるプラークのスクリーニング. M13ファージクローンを 2 セット調製した. 第 1 のセットにはアンピシリン耐性(Amp^r)遺伝子が含まれ, 第 2 のセットにはテトラサイクリン耐性(Tet^r)の遺伝子が含まれる. これら 2 つのセットから少量ずつをとり, 1：1の割合で混合して, 生育した*E.coli* に播いた. 定期的にプラークリフトを行った. プラークリフトには 2 種類のプローブを用い, それぞれDIG Easy Hyb中にて25 ng / mlの濃度で使用した. 第 1 のプローブは, Amp^r 遺伝子に相補的なプローブをDIGラベルしたもので, 第 2 のプローブは, Tet^r 遺伝子に相補的なプローブをビオチンラベルしたものである. 異なる抗体の使用およびCSPDを用いた化学発光による可視化(45秒間の露光)の 2 ステージにより, プローブとターゲットとのハイブリッドを検出した. 2 つのステージ間で, メンブレンからプローブを剥離せず, 1 回目のステージで使用したアルカリホスファターゼ(AP)は50 mM EDTAを用いて不活性化させていない.
結果：パネル Aは, 抗DIG-AP抗体を用いた第 1 ステージの検出を示しています. 可視化されているプラークはAmp^r クローンです. パネル Bは, ストレプトアビジン-APを用いた第 2 ステージの検出を示しています. ストレプトアビジン-APは, ビオチンラベルされたプローブを認識します. 2 つのステージ間にプローブの剥離やAPの不活性化を行っていないことから, パネル Bで可視化されているプラークはAmp^r クローンとTet^r クローンとが混在したものです. パネルAとパネル Bとを比較することにより, Tet^r クローンを識別することが可能です.

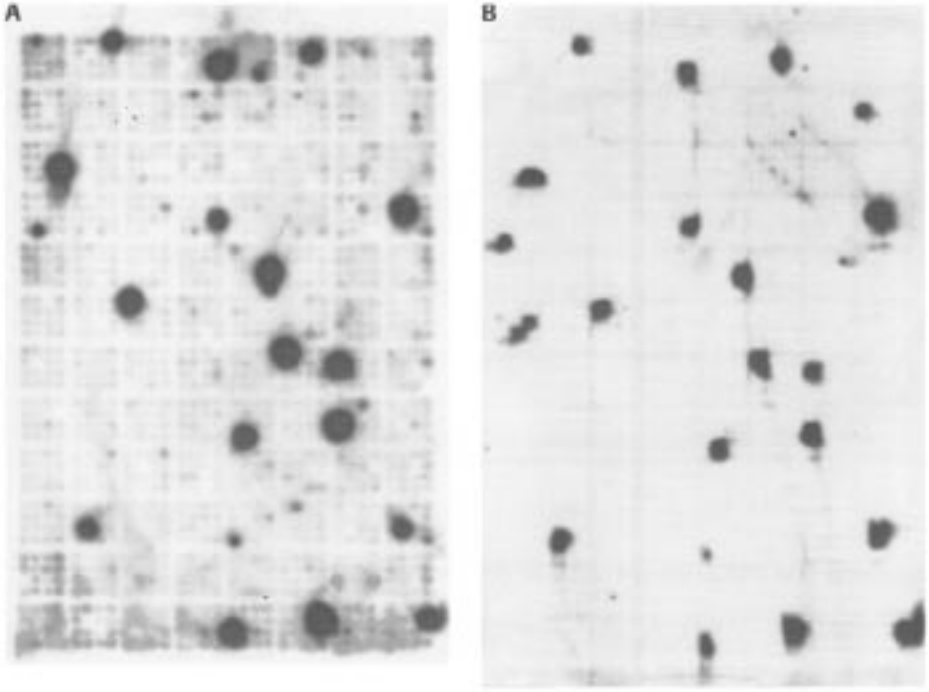


図 21. ラジオアクティブおよびノンラジオアクティブなプローブを用いた高密度コロニースクリーニングの比較. 約2000の細菌コロニーを格子状に高密度で分布させた.^{32}Pラベルプローブ(パネル A)またはDIGラベルプローブ(パネル B)を用い，このコロニーパターンにおけるターゲットのクローン遺伝子の存在についてスクリーニングを行った(データは，Dr. Bouchier, Genethon, Franceのご厚意による).

結果：2 つのスクリーニングでの違いはわずかに 2つです．まず, ラジオアクティブ・プローブでは検出時間に18時間を要したのに対し，DIGラベルプローブによる化学発光検出は15分間でした．また，パネルB(DIGラベルプローブを用いて検出したもの)では，パネルAには見られないクローンがさらに 2 つ可視化されています．これらのクローンは実在することが立証されています. 上の写真のように，それぞれのパネルの露光時間を, コロニーパターンを格子上で示すよう調節させると, 陽性クローンの局在を容易に見つけることが可能になります.

第３章：
その他のノンラジオアクティブアッセイ

1. はじめに …… 138

2. ノンラジオアクティブなウェスタンブロットアッセイ …… 139
2.1 アッセイの概要 …… 140
2.2 ノンラジオアクティブなウェスタンブロットアッセイの代表的な実験結果 …… 142

3. ノンラジオアクティブなテロメアレングスアッセイ …… 142
3.1 アッセイの概要 …… 144
3.2 ノンラジオアクティブなテロメアレングスアッセイの代表的な実験結果 …… 145

4. ノンラジオアクティブなRNaseプロテクションアッセイ …… 146
4.1 アッセイの概要 …… 147
4.2 ノンラジオアクティブなRNaseプロテクションアッセイの代表的な実験結果 … 148

5. ノンラジオアクティブなゲルシフトアッセイ …… 149
5.1 アッセイの概要 …… 150
5.2 ノンラジオアクティブなゲルシフトアッセイの代表的な実験結果 …… 151

6. DIGラベルされたDNAを直接検出する …… 151
6.1 アッセイの概要 …… 152
6.2 PCR DIG Labeling Mixを用いた代表的な実験結果 …… 153
6.3 PCR DIG Probe Synthesis KitおよびPCR DIG Labeling Mixを用いて調製されたハイブリダイゼーションプローブの感度の比較 …… 153

1. はじめに

ロシュ・ダイアグノスティックス社は，ノンラジオアクティブ解析のための幅広い製品群を発売しています． 本書の前の章で解説したDIGシステムのアプリケーションに加え，弊社では以下のアプリケーションに使用するためのノンラジオアクティブなキットおよび試薬を発売しています．

- タンパクのラベリングおよび検出
- テロメアレングスやテロメラーゼアッセイ
- 遺伝子発現の解析

本章では，以下のアッセイについて解説します：

トピックの情報		セクション	ページ
ノンラジオアクティブなウェスタンブロットアッセイ **主要な製品：** Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit	⇒	2	139
ノンラジオアクティブなテロメアレングスアッセイ **主要な製品：** Telo*TAGGG* Telomere Length Assay	⇒	3	142
ノンラジオアクティブなRNaseプロテクションアッセイ **主要な製品：** DIG RNA Labeling Kit（SP6/T7）， RNase Protection Kit	⇒	4	146
ノンラジオアクティブなゲルシフトアッセイ **主要な製品：** DIG Gel Shift Kit	⇒	5	149
DIGラベルされたDNAのゲル上での直接免疫検出 **主要な製品：**PCR DIG Labeling Mix	⇒	6	151

2. ノンラジオアクティブなウェスタンブロットアッセイ

化学発光検出は，ウェスタンブロット上でのタンパクの検出方法として，選択肢の一つになっています． 通常これらのアッセイでは，ターゲットに特異的な一次抗体とペルオキシダーゼ標識された二次抗体を用いて，ブロット上のタンパクの局在を免疫化学的に検出します． それから，この抗体ータンパクの複合体を感度の高いペルオキシダーゼ化学発光基質を用いて可視化させます． この操作に最適な基質はLumi-Light^{Plus} Western Blotting Substrateです．
この基質は非常に高い感度を示します(1〜5.0 pgのターゲットタンパクを検出)．これは，ウェスタンブロット用の他の基質に対して露光時間が長い(アッセイに基質を加えてから12時間以上)という利点をもたらします．つまり，Lumi-Light^{Plus} 基質では，長時間の露光や単一ブロットの複数の露光が可能になります．

Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Substrateは単独の試薬として，また便利なキットに含まれた形[Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit)]で発売されています．キットにはウェスタンブロットの化学発光アッセイをシンプルにするための試薬が含まれています．

ノート：量的に多いタンパクのウェスタンブロットでの検出をルーティンで行う場合のために，Lumi-Light Western Blot Substrateも発売されています． この基質の感度は，Lumi-Light^{Plus} 基質ほどではないものの，高い感度(10〜50 pgのターゲットタンパクを検出)を示します． このLumi-Light基質の発光も長く維持されます(アッセイに基質を加えてから3時間以上)．

このアッセイの主要製品

製品名	カタログ番号	製品の内容
Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit)	2 015 218	● ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG (二次抗体) ● ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG (二次抗体) ● メンブレンブロッキング試薬および洗浄バッファー ● Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Substrate

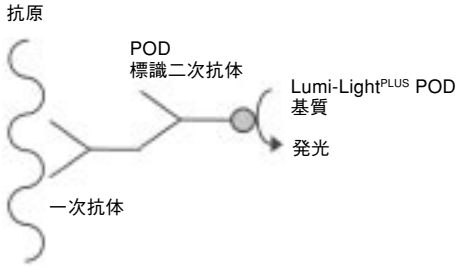
単品試薬として別売される製品

製品名	カタログ番号	製品の説明
Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Substrate	2 015 196	● ペルオキシダーゼの超高感度化学発光基質. ウェスタンブロット上の希少なタンパク検出用. ● ターゲットに特異的な一次抗体とペルオキシダーゼ標識二次抗体とともに用いる. ● 感度：1 ～5.0 pgのターゲットタンパク
Lumi-Light Western Blot Substrate	2 015 200	● ペルオキシダーゼの化学発光基質. ウェスタンブロット上の比較的量の多いタンパク検出用. ● ターゲットに特異的な一次抗体とペルオキシダーゼ標識二次抗体とともに用いる. ● 感度：10～50 pgのターゲットタンパク

2. 1 アッセイの概要

Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit（Mouse/Rabbit）を用いたノンラジオアクティブなタンパクの検出は，以下の実験ステージにより行われます.

ステージ	操作の説明[1]	所要時間
A	SDS，還元剤を用い，70℃に加熱して試料を変性させます.	10分間
B	変性されたタンパクを，アクリルアミド-SDSグラジエントゲルで200 Vで分離します. ***ノート：***Novex社から発売されているプレキャスト 4 ～12% NuPAGE BisTris gel（NP0321）およびNovex社が指定するゲル用バッファーの使用をお薦めします.	1時間
C	分離されたタンパクを25 Vでエレクトロブロッティングし，PVDFウェスタンブロッティング用メンブレンにトランスファーします. ***ノート：***ロシュ・ダイアグノスティックス社から発売されているPVDF Western Blottingメンブレン（Cat. No. 3 010 031）および，NuPAGE Transfer Buffer（NP0006）の使用をお薦めします.	1時間
D	● メンブレンをTBS（Tris buffered saline）で洗浄します. ● メンブレンを1%メンブレンブロッキング試薬[2]を用いてブロックし，非特異的な抗体の結合を防ぎます. ● メンブレンを洗浄用バッファー 2（TBST）[2]で手短に洗います.	2分間×2回 1時間 2分間×4回

ステージ	操作の説明[1]	所要時間
E	● 最適な濃度に希釈された特異的な一次抗体（マウスまたはウサギから生成されたもの）を用いて，ターゲットのタンパクを免疫検出します． ● 洗浄用バッファー2（TBST）[2] を使用し，結合しなかった抗体を除きます．	1時間 2分間×4回
F	● ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG[2] または抗ウサギIgG[2] を1：400に希釈したものを用い，一次抗体の局在を検出します． ● 洗浄用バッファー 2（TBST）[2] を使用し， 結合しなかった抗体を除きます．	30分間 2分間×4回
G	● Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Substrateの調製溶液（基質と増感剤との1：1混合液）[2]をメンブレンに加え，抗原-抗体の複合体を可視化させます．  ● 以下のいずれかの方法により， 化学発光シグナルを記録します： ● メンブレンをX-線フィルムに感光させます． ● イメージャー内で，化学発光シグナルを記録・定量します（第3章を参照）．	5分間 10〜20分間

1 ウェスタンブロッティング操作の詳細については，Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit（Mouse/Rabbit），Cat. No. 2 015 218の取扱説明書を参照ください．取扱説明書は弊社ウェブサイト（http：//www.roche-applied-science.com）からもご覧いただけます．

2 試薬はLumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit（Mouse/Rabbit）の内容物として含まれています．

2. 2 ノンラジオアクティブなウェスタンブロットアッセイの代表的な実験結果

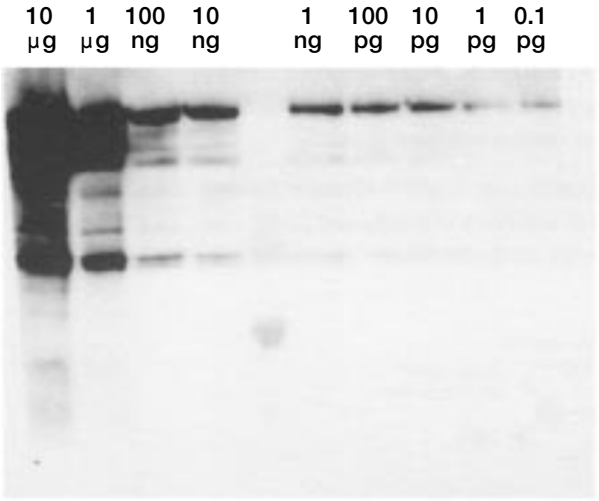


図 31. Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit（Mouse/Rabbit）を用いた，ウェスタンブロット上のピコグラム量のタンパクの化学発光検出. 高度に精製されたβ-ガラクトシダーゼ試料の希釈系列を，ready-to-useのNovex社製 NuPAGE 4-12%グラジエントゲルで分離し，PVDF Western Blottingメンブレンへエレクトロブロットした後，「アッセイの概要」に解説される通りにLumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit（Mouse/Rabbit）の内容物を用いて可視化させた. 抗-β-ガラクトシダーゼモノクローナル抗体を一次抗体として用いた. 各試料中に含まれるβ-ガラクトシダーゼの量は，次の通りである（左から右へ）：10 μg, 1 μg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg および 0.1 pg.

結果：Lumi-Imager F1 Workstationを使用して，ブロット上で最少 0.1 pgまでの精製β-ガラクトシダーゼがLumi-Light^{Plus} Western Blotting Substrateにより検出された.

3. ノンラジオアクティブなテロメアレングスアッセイ

テロメアは，真核生物の染色体の末端に見られる特別なDNA-タンパク構造体です. テロメアDNAは小さなタンデム反復のDNAシークェンス（ヒトでは，TTAGGGシークェンスの反復）により構成されます. このG-リッチなシークェンスは，進化の過程で高度に維持されています. これらは，正常および悪性の両細胞における増殖能および生存期間の決定に関与することが明らかになっています. テロメアの長さを決定することにより，正常細胞の加齢や，疾病のプロセスの調査を補助する重要な情報を提供することが可能です. 例えば，テロメアの長さの顕著な減少から，免疫機能障害や関連する病理現象が示唆されます.

弊社では，ライフサイエンス研究のアプリケーションのために，テロメアの長さを決定するための*T*elo*TAGGG*ノンラジオアクティブアッセイキットを発売しています.

ノート：弊社ではまた，テロメラーゼの活性を解析する*T*eloTAGGGノンラジオアクティブアッセイを 2 種類発売しています. テロメラーゼは，染色体の末端にテロメア反復シークェンスを付加させるリボヌクレオタンパクです. これらのアッセイは，正常体細胞から悪性腫瘍への発展などを研究するアプリケーションにおいて有用と考えられます.

このアッセイの主要製品

製品名	カタログ番号	製品の内容
*Telo**TAGGG* Telomerase Length Assay	2 209 136	●テロメア領域を切断しない 2 種類の制限酵素 ●制限酵素反応用バッファー ●ゲル電気泳動用試薬 ●テロメアのシークェンスに特異的なDIGラベルされたハイブリダイゼーションプローブ ●プローブをサザンブロットにハイブリダイゼーションさせるための試薬 ●プローブとターゲットとのハイブリッドを化学発光検出するための試薬

追加で必要となる製品

製品名[1]	カタログ番号
DNA Isolation Kit for Cells and Tissue	1 814 770
Nylon Membranes, Positively Charged	1 209 299

1 これらの製品に関する詳細な情報については，第 2 章または付録Eのご注文情報を参照ください.

単品試薬として別売される製品

製品名	カタログ番号	製品の説明
*Telo**TAGGG* Telomerase PCR ELISA	1 854 666	テロメラーゼ活性をノンラジオアクティブに検出するためのアッセイキット.
*Telo**TAGGG* Telomerase PCR ELISA^{PLUS}	2 013 789	テロメラーゼ活性をノンラジオアクティブに検出および定量するためのアッセイキット.
LightCycler *Telo**TAGGG* hTERT Quantification Kit	3 012 344	LightCyclerを使用し，ヒトのテロメラーゼ触媒サブユニット hTERTをコードするmRNAを定量検出するためのワンステップRT-PCRキット.
LightCycler *Telo**TAGGG* hTR Quantification Kit	3 012 352	LightCyclerを使用し，ヒトのテロメラーゼ関連RNA（hTR）を定量検出するためのワンステップRT-PCRキット.

3. 1 アッセイの概要

*Telo*TAGGG Telomerase Length Assayを用いて培養細胞や組織試料中のテロメラーゼの長さを決定するノンラジオアクティブな方法は，以下の実験ステージにより行われます．

ステージ	操作の説明[1]	所要時間
A	● DNA Isolation Kit for Cells and Tissueを用い，細胞培養または組織からジェノミックDNAを分離します．	約 2.5時間
B	● 分離されたDNA溶液を卓上遠心機で手短に遠心します． ● DNAを切断する頻度が高くテロメアの反復配列は切断しない制限酵素 2 種類[2]により，分離されたジェノミックDNAを消化させます．	5 分間 2 時間
C	● アガロースゲルで制限酵素消化による産物（低分子フラグメントおよび消化されなかったテロメラーゼの反復配列）を分離します．	2 ～ 4時間
D	● ゲル中でDNAを脱プリン化します． ● ゲル中でDNAを変性させます． ● ゲルを中和します． ● サザンブロット（キャピラリートランスファー法）により分離したDNAフラグメントをポジティブチャージのナイロンメンブレンへトランスファーします． ● UVクロスリンキングまたはベーキングにより，DNAをメンブレンに固定します．	5 ～10分間 15分間×2回 15分間×2回 6 ～16時間 10～20分間
E	● DIG Easy Hyb[2] を用い， ブロットとプレハイブリダイズさせます． ● 末端制限酵素フラグメント（TRFs）を認識するDIGラベルされたプローブ[2] を用い，ブロットとハイブリダイズさせます．	30～60分間 3 時間
F	● アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体[2] およびCDP-*Star* 化学発光アルカリホスファターゼ基質を用い，プローブとTRFとのハイブリッドを検出します． ● X-線フィルムまたはイメージャーを用いて化学発光のシグナルを記録します．	約 2.5時間
G	● イメージャーを用いて，TRFs平均長を計算します． ***ノート：***TRFの長さを計算するには，ゲル上での各テロメアフラグメントの完全な長さと，そのフラグメントが発する化学発光シグナルの強度を決定する必要があります．これらのパラメーターを合計し一般化することにより， 平均的なTRFの長さが得られます．イメージャー上で，これらの計算のために特にデザインされたソフトウェアのマクロを使用することにより，値の決定を最も簡単に行うことが可能です．	約30分間

1 テロメアレングスアッセイを行う方法の詳細については，*Telo*TAGGG Telomerase Length Assay, Cat. No. 2 209 136の取扱説明書を参照ください．
取扱説明書は， 弊社のウェブサイト（http：/www.roche-applied-science.com）でもご覧いただけます．
2 試薬は*Telo*TAGGG Telomerase Length Assayの内容物として含まれています．

3. 2 ノンラジオアクティブなテロメアレングスアッセイの代表的な実験結果

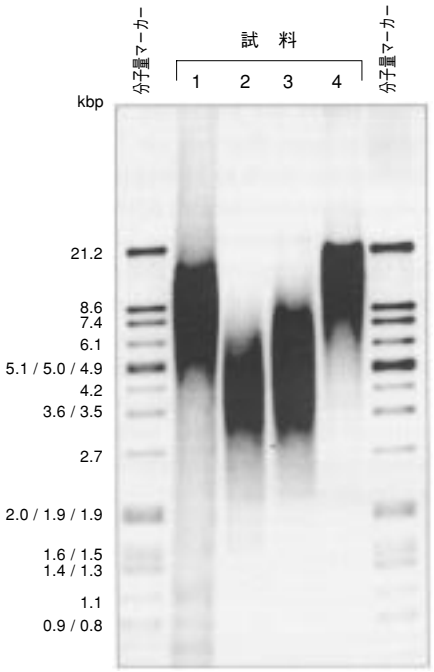


図 32. *Telo TAGGG* Telomere Length Assayを用いた種々の不死細胞系における平均的なTRFの長さの決定.
不死の細胞系(Immortalized cell lines試料 1 ～ 4)のテロメアの長さについて,「アッセイの概要」で解説される方法で解析を行った. 各試料中のテロメアフラグメントの長さを, それぞれ既知の分子量をもつスタンダード(MWM)と比較することにより決定した. Lumi-Imager F1 Workstationで, 各フラグメントが発する化学発光シグナルの強度により決定した長さを利用して, 各細胞系におけるTRFの平均長を計算した.
試料 1：Ag8.653細胞.
試料 2：コントロールDNA, 低分子量
（アッセイキットに含まれる）
試料 3：K562細胞
試料 4：コントロールDNA, 高分子量
（アッセイキットに含まれる）

結果：計算されるTRFの平均長は, それぞれ次の通りでした.
試料 1：7.4kb, 試料 2：3.9 kb, 試料 3：4.6 kb,
試料 4：10.2 kb.

4. ノンラジオアクティブなRNaseプロテクションアッセイ

リボヌクレアーゼプロテクションアッセイは，以下の目的のための強力なツールです：

- 特異的なRNAの検出および定量
- 遺伝子のトランスクリプション開始および終止サイトのマッピング
- 遺伝子のイントロン-エクソン構造の決定
- 欠失，挿入，あるいは転位のような変異検出

ノンラジオアクティブなRNaseプロテクションアッセイには，DIGラベルされたアンチセンスRNAプローブによるターゲットのセンスRNAへのハイブリダイゼーションが含まれます．一本鎖に特異的なRNaseがハイブリダイズしなかったプローブ領域を消化した後，標準的なブロッティングのテクニックにより「保護」されたプローブ部分を検出します．

この方法では，DNA：RNAハイブリダイゼーションによるテクニック（S1マッピング）に比べて，次のような利点があります：

- トランスクリプション用キットにより，ラベルされたRNAを簡単かつ多量に生成することが可能です．
  また，このことからアッセイの所要時間が短縮されます．
- RNA：RNAハイブリッドは，DNA：RNAハイブリッドに比べて安定であるため，アッセイの感度および特異性が高くなります．
- RNaseを用いた消化では，DNaseによる消化よりも産物が少ないため，目的でない不正確な実験結果が発生する可能性は低くなります．

このアッセイの主要製品

製品名	カタログ番号	製品の内容
DIG RNA Labeling Kit（SP6/T7）	1 175 025	● DNAテンプレート，コントロールDNAおよびRNA ● NTPラベリング混合液，トランスクリプションバッファー ● DNase I，RNaseインヒビター ● SP6およびT7 RNAポリメラーゼ
RNase Protection Kit	1 427 580	● ハイブリダイゼーション，RNase消化および試料の電気泳動調製用の，各種バッファー ● RNase T1，RNase A ● SDSおよびプロティナーゼ K（RNaseの不活性化用） ● ハイブリッドRNAのエタノール沈殿用キャリアーtRNA ● コントロールRNAおよびDNA

追加で必要となる製品

製品名[1]	カタログ番号
Anti-DIG-AP, Fab fragments	1 093 274
Nylon Membranes, Positively Charged	1 209 299
Ready-to-use CDP-*Star*	2 041 677
DIG Wash and Block Buffer Set	1 585 762

1 これらの製品に関する詳細な情報については，第 2 章または付録Eのご注文情報を参照ください．

4. 1 アッセイの概要

DIG RNA Labeling KitおよびRNase Protection Kitを用いたノンラジオアクティブなRNaseプロテクションアッセイは，以下の実験ステージにより行われます.

ステージ	操作の説明	所要時間
A	転写されるターゲットのDNAシークェンスおよびSP6またはT7のプロモーターシークェンスをもつトランスクリプション用ベクターまたはPCR産物を調製[1] します.	多様
B	● DIG RNA Labeling Kit（SP6/T7）[1]の内容物を用い, 転写およびアンチセンスRNAプローブのDIGラベルを行います. ● RNase-free DNase I[1] を用い，DNAテンプレートを取り除きます. ● 直接検出操作[1] により，DIGラベルされたプローブを定量します.	2 時間 20分間 約 2 時間
C	標準的なRNA分離法により, トータルRNAまたはmRNAのようなターゲット（センス）RNAを調製します.	多様
D	RNase Protection Kit[2] の内容物を用いて，DIGラベルRNAプローブとターゲットRNAとをハイブリダイズさせます.	4 〜16時間
E	● RNase T1を用いてRNAのハイブリッドを消化し, RNA混合物のうちハイブリダイズしていない（一本鎖の）領域全てを取除きます[2]. ● SDSおよびプロティナーゼ Kを用いてハイブリッド混合物からRNase T1を取り除きます[2].	30分間 15分間
F	● 消化されたRNAを，グリコーゲン（キャリアー分子）存在下でエタノール沈殿させます. ● 遠心によりRNAをペレット化させ，ペレットを乾燥させます. ● RNAを試料ローディング用バッファー中に再懸濁させ, 95℃でRNAを変性させます. ● 変性アクリルアミドで，試料を泳動します. ***ノート：*** Novex社製のプレキャスト 6% QuickPoint gels（QP9731）, QuickPoint 試料ローディングバッファー（QP9239）およびQuickPoint 泳動バッファー（QP9732）の使用をお薦めします.	25分間 30分間 5 分間 25〜30分間
G	● 泳動により分離された産物を, ポジティブチャージのナイロンメンブレンにコンタクトブロッティング[1]によりトランスファーします. ● UVクロスリンキングまたはベーキングによりRNAをメンブレンに固定します[1].	20分間 10〜30分間
H	DIGラベルされたプローブのうち，二本鎖の状態で「保護」されている部分を，アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体およびCDP-*Star* アルカリホスファターゼ化学発光基質を用いて検出します[1]. ***ノート：*** 検出操作には，DIG Wash and Block Buffer Set の内容物も使用されます.	約 2.5時間
I	X-線フィルムまたはイメージャーを用いて化学発光シグナルを記録します.	5 〜20分間

1 これらの製品に関する詳細な情報については，第2章のセクション 2.3, 2.5, 3.2 および 4.1を参照ください.
2 ノンラジオアクティブなRNaseプロテクションアッセイ操作の詳細については, RNase Protection Assay Kit, Cat. No.1 427 580の取扱説明書を参照ください.
この取扱説明書は，弊社のウェブサイト（http：//www.roche-applied-science.com）でもご覧いただけます.
試薬はRNase Protection Kit の内容物として含まれています.

4. 2 ノンラジオアクティブなRNaseプロテクションアッセイの代表的な実験結果

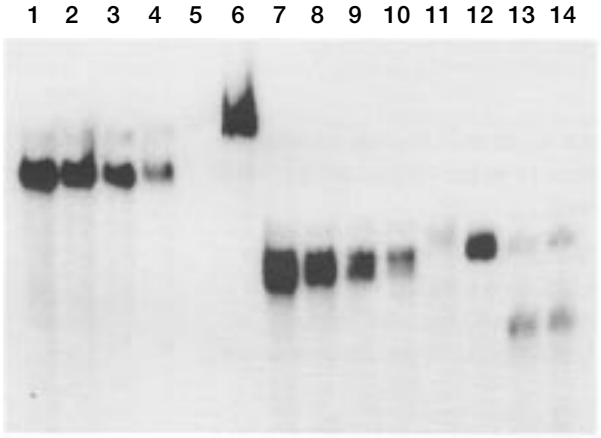


図 33. ノンラジオアクティブなRNaseプロテクションアッセイによるハウスキーピング遺伝子GAPDHおよびβ-アクチンの検出. 2種類のアンチセンスRNAプローブを，T7 RNAポリメラーゼを用いて転写およびDIGラベルした．GAPDHを検出するため，プラスミドpTRI-GAPDH human（Ambion社）から403-ヌクレオチドのアンチセンスRNAプローブを転写した．β-アクチンの検出には，RNase Protection Assay Kit中に含まれるコントロールDNAテンプレート（ヒトβ-アクチン遺伝子のインサートを含む直鎖 pA544 DNA）から，255-ヌクレオチドのアンチセンスRNAプローブを転写した．これらのアンチセンスRNAプローブ（1 ng / アッセイ）を，45℃，オーバーナイトでターゲットのRNA（ヒト全脳由来のトータルRNA，0.5 ～5 μg試料）にハイブリダイズさせた．プローブとターゲットとのハイブリッドを（「アッセイの概要」で解説したように）RNaseプロテクションアッセイし，化学発光検出（Lumi-Imagerにて 5 分間露光）した．

上図のブロットは，それぞれ以下のプローブとターゲットRNAを用いて行ったアッセイの結果である：

レーン 1：プローブ, GAPDH ;
ターゲット, 5.0 μgヒト脳由来トータルRNA

レーン 2：プローブ, GAPDH ;
ターゲット, 2.5 μgヒト脳由来トータルRNA

レーン 3：プローブ, GAPDH ;
ターゲット, 1.0 μgヒト脳由来トータルRNA

レーン 4：プローブ, GAPDH ;
ターゲット, 0.5 μgヒト脳由来トータルRNA

レーン 5：プローブ, GAPDH ; 陰性コントロール
（20 μg 酵母tRNA）

レーン 6：プローブ, GAPDH ; 陽性コントロール（未処理）, 1 / 10量のプローブのみを使用.

レーン 7：プローブ, β-アクチン;
ターゲット, 5.0 μgヒト脳由来トータルRNA

レーン 8：プローブ, β-アクチン;
ターゲット, 2.5 μgヒト脳由来トータルRNA

レーン 9：プローブ, β-アクチン;
ターゲット, 1.0 μgヒト脳由来トータルRNA

レーン 10：プローブ, β-アクチン ;
ターゲット,0.5 μgヒト脳由来トータルRNA

レーン 11：プローブ, β-アクチン;陰性コントロール
（20 μg酵母tRNA）

レーン 12：プローブ, β-アクチン;陽性コントロール
（未処理）, 1 / 10量のプローブのみを使用.

レーン 13：プローブ, β-アクチン ;キットのコントロール（0.2 pg ヒトβ-アクチンのセンス転写産物と酵母RNAとの混合物）

レーン 14：プローブ, β-アクチン ;キットのコントロール（0.1 pg ヒトβ-アクチンのセンス転写産物と酵母RNAとの混合物）

結果：オリジナルの消化されていないプローブのサイズを，陽性コントロールのレーン 6（GAPDH, 403ヌクレオチド）およびレーン 12（β-アクチン, 255ヌクレオチド）に見ることができます．陰性コントロール（レーン 5 および 11）では，シグナルは検出されません．

Lumi-Imager で 5 分間露光させただけで，わずか0.5 μg の実験的なターゲットRNA（レーン 4, 10）におけるプロテクト作用が観察されます．

ヒト全脳由来の実験的なターゲットRNAでは，すべての濃度（レーン 1 ～ 4 および 7 ～10）においてアンチセンスRNAプローブのフラグメントのプロテクト作用が見られます．コントロールRNA転写産物（210ヌクレオチドをプロテクトする）では，わずか 0.1 pgでアッセイに作用しています（レーン 14）．ラジオアクティブ・ラベルされたプローブを用いたRNaseプロテクション実験では，10 μg のターゲットRNAが必要です．

5. ノンラジオアクティブなゲルシフトアッセイ

「ゲル移動度シフト」または「電気泳動移動度シフト(EMSA)」のアッセイは，DNA-タンパク間の相互作用を特徴づけるための迅速かつシンプルなテクニックです． このテクニックは，ネガティブ(非変性)ポリアクリルアミドまたはアガロースゲルにおけるフリーのDNAとDNA-タンパク複合体との移動度の違いに基づきます．

このアッセイの主要製品

製品名	カタログ番号	製品の内容
DIG Gel Shift Kit, 2nd generation	3 353 591	● タンパクに結合するオリゴヌクレオチドの末端にDIG-ddUTPをラベルするための試薬 ● ゲルシフトアッセイ中における生成物の結合を防ぐための，競合DNA ● ゲルローディングバッファー ● アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体 ● CSPDアルカリホスファターゼ化学発光基質を含む化学発光検出用試薬 ● コントロールファクターOct2A ● コントロールオリゴヌクレオチド，DIGラベルされたものと，ラベルされていないものの両方

追加で必要となる製品

製品名[1]	カタログ番号
Nylon Membranes, Positively Charged	1 209 299
DIG Wash and Block Buffer Set	1 585 762

1 これらの製品に関する詳細な情報については，第 2 章または付録 E のご注文情報を参照ください．

5. 1 アッセイの概要

ノンラジオアクティブなゲルシフトアッセイは，以下の実験ステージにより行われます.

ステージ	操作の説明	所要時間
A	● ターミナルトランスフェラーゼおよびDIG-ddUTPを用い，二本鎖オリゴヌクレオチドプローブやDNAフラグメント(30〜100塩基が理想的なサイズ)の 3'末端をラベルします[1]. ● DIGラベルされたプローブを定量します[2].	15分間 約 2 時間
B	DIGラベルされたオリゴヌクレオチド(タンパク結合シークェンスを含む)を細胞抽出液または部分的に精製されたDNA結合性タンパク(コントロールのファクターOct2Aなど)とインキュベートします[1]. ***ノート：***競合DNA[ポリ d(A-T)またはポリ d(I-C)]を添加することで，特に細胞抽出試料中における非特異的なDNA-タンパク複合体の形成を防ぎます.	15分間
C	ネガティブ(非変性)ポリアクリルアミドゲルで, 0.5 × TBEバッファーを用い，70 Vにてアッセイの混合物を分離します. ***ノート：***Novex社製の 5 × High-Density TBE Sample Buffer (LC6678)，プレキャスト 6% DNA Retardation Gel (EC6365]，および XCell II Mini Cell (E19001)の使用をお薦めします.	50〜60分間
D	0.5 × TBEバッファー中にて 30 Vでのエレクトロブロッティングにより，分離産物をポジティブチャージのナイロンメンブレンへトランスファーします. ***ノート：***Novex社製のXCell II Blot Module(E19051)の使用をお薦めします.	1 時間
E	DIGラベルされたDNA-タンパク複合体を, アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体およびCSPDアルカリホスファターゼ化学発光基質を用いて検出します[2]. ***ノート：***検出操作には, DIG Wash and Block Buffer Setも使用されます.	およそ 2.5時間
F	X-線フィルムまたはイメージャーを用いて化学発光のシグナルを記録します.	5〜20分間

1 ノンラジオアクティブなゲルシフトアッセイ操作の詳細については，DIG Gel Shift Kit, 2nd generation Cat. No. 3 353 591 の取扱説明書を参照ください.
この取扱説明書は，弊社のウェブサイト(http：//www.roche-applied-sciene.com)でもご覧いただけます.
試薬はDIG Gel Shift Kit の内容物として含まれています.
2 これらの製品に関する詳細な情報については，第 2 章のセクション 4.1を参照ください.

5. 2 ノンラジオアクティブなゲルシフトアッセイの代表的な実験結果

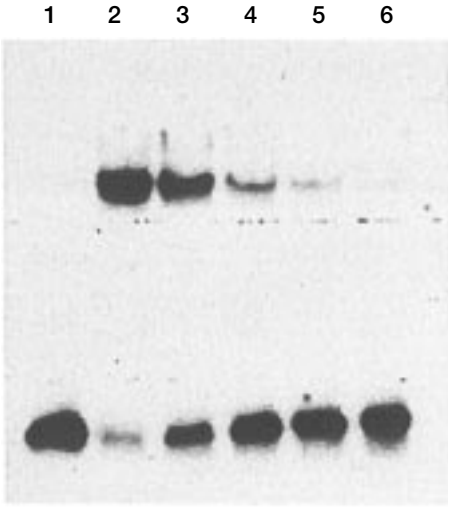


図 34. Oct2Aコントロールタンパクとオリゴヌクレオチドを用いたDIGゲルシフトアッセイ. コントロールOct2Aタンパクとさまざまな量のOct2A-結合オリゴヌクレオチド(DIG Gel Shift Kitに含まれる)を用いて，ゲルシフトアッセイを行った．反応により得られた複合体を12.5%のネガティブポリアクリルアミドゲルで分離し，エレクトロブロットによりナイロンメンブレンへトランスファーした. DIGラベルされた複合体を化学発光アッセイにより検出した(CSPD基質を用い，X-線フィルムに30分間露光)。
レーン1： DIGラベルされたOct2A結合サイトを持つコントロールオリゴヌクレオチド(0.8 ng)，レーン 2：DIGラベルされたコントロールオリゴヌクレオチド(30 fmol)を 50 ng の Oct2A コントロールタンパクとインキュベーションしたもの，レーン 3〜6： レーン2と同様， ただしラベルされていないコントロールのヌクレオチド量を増やしながらインキュベーションを行った(25, 62, 125, および250倍の過剰量，左から右へ)． 上側のバンドはタンパクとオリゴヌクレオチドとの複合体，下側のバンドは結合しなかったオリゴヌクレオチドである.

結果：Oct2Aコントロールタンパクは， DIGラベルされたコントロールオリゴヌクレオチドのサイトに特異的に結合しました(レーン 2). ラベルされていないオリゴヌクレオチド量を上げることにより(レーン 3 〜 6)，ラベルされたオリゴヌクレオチドとタンパクとの結合に競合が生じていることから，この反応が特異的であることが分かります.

6. DIGラベルされたDNAを直接検出する

PCR産物のDIGラベリングと，ナイロンメンブレンにトランスファーされたDIGラベルされたDNAの直接免疫検出は，臭化エチジウム染色に対して1000倍の感度をもたらします(以下のセクション 6.2「PCR DIG Labeling Mixを用いた代表的な実験結果」を参照ください).

このアッセイの主要製品

製品名	カタログ番号	製品の内容
PCR DIG Labeling Mix, 10 × 濃度	1 585 550	以下の濃度のヌクレオチドを水に溶解させた混合液 (10 × 濃度)， pH 7. ● dATP, 2 mM ● dCTP, 2 mM ● dGTP, 2 mM ● dTTP, 1.9 mM ● DIG-11-dUTP,アルカリ安定, 0.1 mM

追加で必要となる製品

製品名[1]	カタログ番号
Anti-DIG-AP, Fab fragments	1 093 274
Nylon Membranes, Positively Charged	1 209 299
Ready-to-use CDP-*Star*	2 041 677
DIG Wash and Block Buffer Set	1 585 762

1 これらの製品に関する詳細な情報については，第 2 章または付録 Eのご注文情報を参照ください.

6.1 アッセイの概要

PCR DIGラベリング混合液を用いて調製されたDNAの直接免疫検出には，以下の実験ステージにより行われます.

ステージ	操作の説明	所要時間
A	PCR DIG Labeling Mixを含む反応混合液を用いたPCRにより，ターゲットDNAを増幅させます[1].	約2時間
B	試料をアガロースゲル分離します(TBEまたはTAEバッファー中で).	30分間 ～2時間
C	分離されたDNA増幅産物を, キャピラリートランスファーによりポジティブチャージのナイロンメンブレンにトランスファーします[2]. ***ノート：***トランスファー前にDNAを変性させる必要はありません.	オーバーナイト
D	DIGラベルされたターゲットDNAを, アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体およびCDP-*Star* アルカリホスファターゼ化学発光基質を用いて検出します[2]. ***ノート：***検出操作には, DIG Wash and Block Buffer Setも使用されます.	約 2.5時間
E	X-線フィルムまたはイメージャーを用いて化学発光のシグナルを記録します.	5～20分間

1 直接ラベリング操作の詳細については，PCR DIG Labeling Mix, Cat. No. 1 585 550 の取扱説明書を参照ください. この取扱説明書は，弊社のウェブサイト(http：//www.roche-applied-sciene.com)でもご覧いただけます.
2 これらの製品に関する詳細な情報については，第 2 章のセクション 3.1, 4.1を参照ください.

6. 2 PCR DIG Labeling Mixを用いた代表的な実験結果

DIGラベルされた産物の直接検出と臭化エチジウム染色との感度の比較

検出方法	検出可能なPCR産物	ラベルされた産物の由来
臭化エチジウムによる染色	ゲル上のラベルされていないDNA	1 pg テンプレート
直接免疫検出	ブロット上のDIGラベルされたDNA	1 fg テンプレート

1 この方法の詳細については，セクション 6.1「アッセイの概要」を参照ください.

6.3 PCR DIG Probe Synthesis KitおよびPCR DIG Labeling Mixを用いて調製されたハイブリダイゼーションプローブの感度の比較

PCR DIG Labeling Mixは，直接検出用のPCR産物のラベルのみに使用してください．この混合試薬をハイブリダイゼーションプローブ用のPCR産物のラベルには使用しないでください.

説明：PCR DIG Labeling Mixにおけるラベルされていないヌクレオチドに対するDIGラベルされたヌクレオチドの比率(DIG-dUTP：dTTP)は非常に低く設定されています(1：20)．これは，ラベルされた産物の分子量を著しく変えることのない低いレベルでのDIGラベルを可能にしています．このレベルのDIGラベルは直接検出には十分ですが，サザンブロットでシングルコピー遺伝子(あるいはノーザンブロットで希少なRNA)を検出するために必要な感度の高いハイブリダイゼーションプローブの合成には適しません(図35).

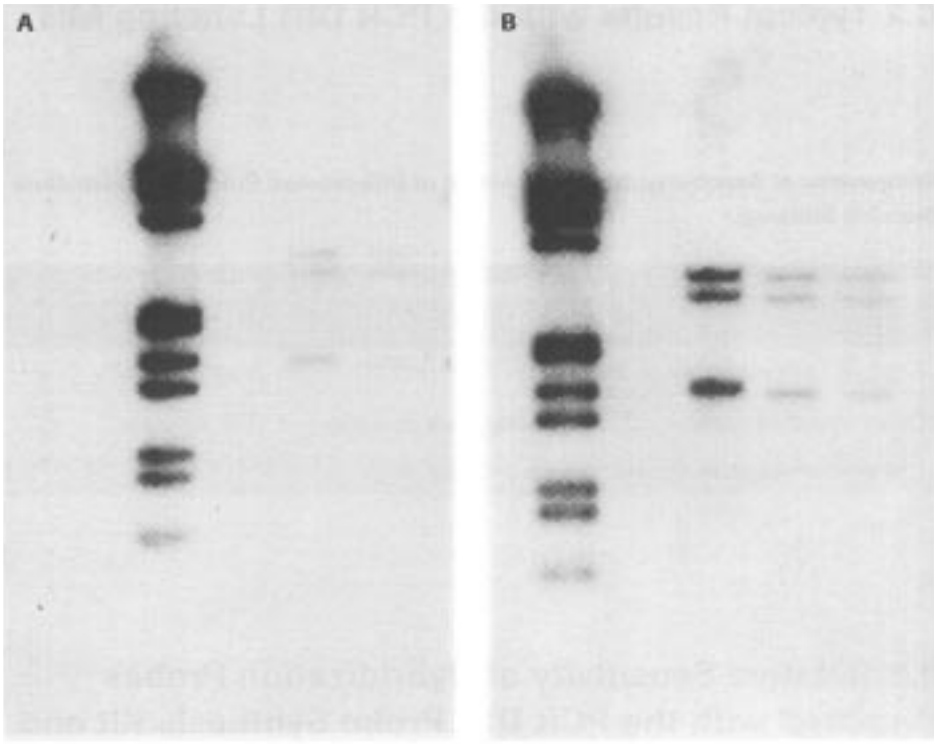


図 35. 異なる濃度のDIG-dUTPを用いて生成されたDIGラベルされたプローブの感度の比較. PCR DIG Probe Synthesis Kit中に採用されている 1：3 = DIG-dUTP：dTTPの混合比で調製されたプローブ(パネルB)と，PCR DIG Labeling Mix中に採用されている 1：20 = DIG-dUTP：dTTPの混合比で調製されたプローブ(パネル A)の2種類を用いて，感度の比較を行った．それぞれのプローブは442 bpで，ヒトのtPAシークェンスを認識した．異なる量のヒトDNA(各パネル左から 10, 5, および 2.5 μg)のサザンブロットからターゲットのシークェンスを検出するためにこのプローブを使用した．DIGラベルされたDNA分子量マーカーを，それぞれのブロットの左側に含めた．

結果：1：3 = DIG-dUTP：dTTPの混合比で調製されたプローブでは，3本のtPAのバンドが2.5 μgのDNAにおいて明瞭に検出されました(パネルB)．1：20 = DIG-dUTP：dTTPの混合比で調製されたプローブでは，tPAのフラグメントが10および5 μgの試料中にかすかなバンドとして検出されただけで，2.5 μgの試料中のバンドは全く検出されませんでした．

結論：PCR Labeling Mixは，複雑な試料中からシングルコピー遺伝子を検出するのに十分な感度のプローブを生成しません．**高感度なハイブリダイゼーションプローブのラベルをするには，常に(第 2 章のセクション 2.2で解説されているように)PCR DIG Probe Synthesis Kitを使用してください.**

付　録：

付　録 A：DIGの基礎のまとめ …… 156
1. DIGラベリング …… 156
2. 電気泳動とブロットトランスファー …… 157
3. プローブをターゲット核酸にハイブリダイズさせる …… 158
　DNA：DNAハイブリッドに最適なハイブリダイゼーション温度の算出 …… 159
　オリゴヌクレオチドプローブに最適なハイブリダイゼーション温度の算出 …… 160
4. ブロットのストリンジェント洗浄 …… 160
　低ストリンジェンシー洗浄 …… 160
　高ストリンジェンシー洗浄 …… 160
5. アルカリホスファターゼ基質の感度 …… 161

付　録 B：DIGシステムのトラブルシューティング …… 162
1. 発生しやすい問題と推奨される解決方法 …… 162
　問　題 1：シグナルが弱すぎる，またはシグナルが強すぎる …… 162
　問　題 2：メンブレン全体に高いバックグラウンドを生じる …… 163
　問　題 3：不均一な雲様のバックグラウンドを生じる …… 163
　問　題 4：不明瞭なしみ，粒状のバックグラウンドを生じる …… 164
　問　題 5：メンブレンの一部にのみ高いバックグラウンドを生じる …… 164
　問　題 6：スポット状のバックグラウンドを生じる …… 165
　問　題 7：バンドの上に灰色の円形の影を生じる …… 167
　問　題 8：メンブレンによってカバーされない部分で，X-線フィルム上にスポット状のバックグラウンドを生じる …… 167
　問　題 9：メンブレン上にバックグラウンドは見られないが，レーンを横切るように非特異的なしみ状のシグナルが現れる …… 168
　問　題 10：バンドが拡散する …… 168
　問　題 11：バンドが見られない …… 169
　問　題 12：ノーザンブロットで，非特異的なrRNAのハイブリダイゼーションシグナルが見られる …… 169
　問　題 13：メンブレンに複合的なバックグラウンドや汚れを生じる …… 170
2. シングルコピー遺伝子の検出をより簡単に最適化するには …… 171

付　録 C： DIGラベリングおよび検出結果を改善するには …… 174

付　録 D： 各種溶液の調製 …… 183

付　録 E： ご注文情報とDIGシステムの製品一覧 …… 188

付　録

トピックの情報		セクション	ページ
DIGの基礎のまとめ	⇒	A	156
DIGシステムのトラブルシューティング	⇒	B	162
DIGのラベリングと検出の結果を改善するには	⇒	C	174
各種溶液の調製	⇒	D	183
ご注文情報とDIGシステムの製品一覧	⇒	E	188

付録 A：DIGの基礎のまとめ

ノート：本書の第 1 章で紹介した情報を下表にまとめました. DIGの基礎に関する各論については, 第 1 章を参照ください.

1. DIGラベリング

DIGラベリングの方法：必要とされるテンプレートやプローブの感度

ラベリングの方法	必要とされるテンプレートおよび量	ラベルされたプローブの感度
PCRラベリング	● プラスミドDNA : **10 pg**（10〜100 pgの範囲）[1] ● ジェノミックDNA : **10 ng**（1〜50 ngの範囲）[1]	0.1〜0.03 pg DNA
ランダムプライムドラベリング（DIG-High Prime）	● 10 ng〜3 μg DNA	0.1〜0.03 pg DNA
RNAラベリング	● 直鎖化したプラスミドDNA : 1 μg ● プロモーターを持つPCR産物：100〜200 ng	0.1〜0.03 pg DNA 0.1〜0.03 pg RNA

ラベリングの方法	必要とされるテンプレート量	ラベルされたプローブの感度
ニックトランスレーション	● 0.1～2 μg DNA	主に*in situ* のアプリケーションに使用される. 感度はターゲットに依存する.
3'末端ラベリング	● 100 pmol オリゴヌクレオチド	10 pg DNAまたはRNA
3'末端テーリング	● 100 pmol オリゴヌクレオチド	1 pg DNAまたはRNA
1 太字は推薦される量です．最良の結果を得るには，ターゲット量を低く保つことをお薦めします.		

2. 電気泳動とブロットトランスファー

ゲルにロードするターゲット核酸の量

ブロットのタイプ	DIGラベルされたプローブのタイプ	ゲルにロードするターゲットの量	備　考
サザンブロット	DNAまたはRNA	● プラスミドDNA：< 1 ng ● ジェノミックDNA：1.0, 2.5, 5.0 μg（3 通りの試料） ***注意：***10 μgを上回るジェノミックDNAをロードしないでください.	10 μg のヒトジェノミックDNAの1 試料中には, 3 kb のシングルコピー遺伝子 1 種類が10 pg 含まれています. DIGラベルされたプローブが0.1 pg のターゲットを検出することから, この 3 kbのターゲットは10 μg（あるいは 1 μg）量の試料中から十分に検出可能です.
ノーザンブロット	RNA	● トータルRNA：1 μg ● mRNA： 100 ng ***注意：***ラジオアクティブなプローブで通常使用する量のトータルRNA（10～20 μg）やmRNA（1 μg以上）をロードしないでください.	DIGラベルされたRNAプローブは, 以下のターゲットを検出します： ● わずか 5 ng のトータルRNA中における発現量の多いmRNA（アクチンmRNA）. ● わずか50 ng のトータルRNA中における発現量の希少なmRNA（CTF1 mRNA）.
	DNA	● トータルRNA：5 μg ● mRNA：500 ng ***注意：***ラジオアクティブなプローブで通常使用する量のトータルRNAやmRNAをロードしないでください.	

3. プローブをターゲット核酸にハイブリダイズさせる

DIGラベルされたプローブのハイブリダイゼーション中での濃度

プローブのタイプ	プローブ濃度
ランダムプライムドラベルされたDNA	25 ng / ml
PCRラベルされたDNA	2 µl / ml
トランスクリプションによりラベルされたRNA	20〜100 ng / ml
末端ラベルされたオリゴヌクレオチド	1〜10 pmol / ml
テールラベルされたオリゴヌクレオチド[1]	0.1〜10 pmol / ml

1 テールラベルされたオリゴヌクレオチドをプローブとして使用する場合は, プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションバッファー中に0.1 mg / ml のポリ[A]および 5 µg / ml のポリ[dA]を加えます. これらのポリヌクレオチドは, テール付加により生じる非特異的なシグナルを防ぎます.

代表的なハイブリダイゼーション時間

アプリケーション	お薦めする ハイブリダイゼーション時間[1, 2]
DNA：DNAハイブリダイゼーション	
シングルコピー遺伝子の検出	ON
DNAフィンガープリンティング（多遺伝子座プローブ）	2 〜 4 時間
DNAフィンガープリンティング（単一遺伝子座プローブ）	ON（12〜16時間）[3]
コロニー / プラークハイブリダイゼーション	少なくとも 4 〜 6 時間（ONまで）
RNA：RNAハイブリダイゼーション	少なくとも 4 〜 6 時間（ONまで）
オリゴ：DNAハイブリダイゼーション	少なくとも 1 〜 6 時間（ONまで）

1 全てのアプリケーションについて, プレハイブリダイゼーション（プローブを含まない）時間は30分間です.
2 ONは, オーバーナイトを意味します.
3 DIG Easy Hybを用いる場合, 4 〜 6 時間で完了します.

最適なハイブリダイゼーション温度[1]

ハイブリッドのタイプ	最適な温度
DNA：DNA	42℃（37℃〜42℃の範囲）
DNA：RNA	50℃
RNA：RNA	68℃

1 これらの温度は, 40%のGC含有率を持つ哺乳類の核酸について, DIG Easy Hybまたは50%フォルムアミドを含む標準的なバッファーを用いてハイブリダイゼーションを行う場合のものです.
その他のハイブリダイゼーション温度の計算については, 以下を参照ください.

DNA：DNAハイブリッドに最適なハイブリダイゼーション温度の算出

プローブとターゲットとのハイブリッドに最適なハイブリダイゼーション温度(T_{hyb})は，以下の計算式により算出されます．使用するハイブリダイゼーション用バッファーに応じた計算式を使用するよう注意してください．

使用するハイブリダイゼーション用バッファー	T_{hyb} 算出のために常に使用する計算
DIG Easy Hyb	計算 1
DIG Easy Hyb以外のバッファー全て	計算 2

計算1（DIG Easy Hybのみ）

DIG Easy Hyb中のDNA：DNAハイブリッドに対する最適なハイブリダイゼーション温度(T_{hyb})の算出には，**常に**この計算式を使用します．

T_m = 49.82 + 0.41（% G + C）−（600/L）

T_{hyb} = T_m −（20℃〜25℃）

T_m = プローブとターゲットとのハイブリッドの融点（解離点）

（% G + C）= プローブのシークェンス中におけるGおよびC 残基の含有率（%）

T_{hyb} = DIG Easy Hyb中におけるプローブのターゲットに対するハイブリダイゼーションの最適温度

ノート：この計算式は，GC含有率が 40 %，ターゲットとのホモロジーが 80〜100 %のプローブに対して有効です．ホモロジーが80%未満のプローブのT_{hyb}は，上記で計算される温度よりも低くなりるため（1 % のミスマッチごとに約 1.4℃），実験的にT_{hyb}を決定する必要があります．

L = ハイブリッドの長さ（塩基対 ; bp）

例 1： % G + Cが 50 %，L = 72 bpのプローブの，DIG Easy Hyb中でハイブリダイゼーションを行う場合：

T_m = 49.82 + 0.41（50）− 600 / 72 = 62℃（DIG Easy Hyb中）

T_{hyb} = 62℃−（20℃〜25℃）= 42℃〜37℃（DIG Easy Hyb中）

計算 2（DIG Easy Hyb以外のすべてのバッファー）

DIG Easy Hyb以外のバッファー中のDNA：DNAハイブリッドに対する最適なハイブリダイゼーション温度(T_{hyb})の算出には，常にこの計算式を使用します．

T_m = 16.6 log［Mol Na^+］+ 0.41（% G + C）+ 81.5

T_{hyb} = T_m − 25℃

T_m = フォルムアミドが存在しない場合のプローブとターゲットとのハイブリッドの融点（解離点）

ノート：フォルムアミドを 1 % 加えると算出されるT_mよりも0.72℃低くなります．50 %フォルムアミドを加える場合，計算されるT_mよりも36℃（0.72℃ × 50）低くなります．

Mol Na^+ = ハイブリダイゼーション用バッファー中のナトリウム塩のモル濃度

（% G + C）= プローブのシークェンス中における G およびC 残基の含有率（%）

T_{hyb} = プローブのターゲットに対するハイブリダイゼーションの最適温度

ノート：この計算式は，ターゲットとのホモロジーが 80〜100 % のプローブに対して有効で，シークェンス間のミスマッチが最大 20 % まで許容されます．ホモロジーが80%未満のプローブのT_{hyb}は，上記で計算される温度よりも低くなりるため（1%のミスマッチごとに約1.4℃），実験的にT_{hyb}を決定する必要があります．

例 2： 3 × SSC（Mol Na^+ = 0.585 M）のハブリダイゼーションバッファー中で，% G + C が 50 % のプローブを用いてハイブリダイゼーションを行う場合：

T_m = 16.6 log［0.585］+ 0.41（50）+ 81.5 = 98℃

T_{hyb} = 98℃ − 25℃ = 73℃（フォルムアミドを含まない場合）

T_{hyb} = ［98℃ − 0.72℃（50）］−25℃= 37℃（50 % フォルムアミドを含む場合）

オリゴヌクレオチドプローブに最適なハイブリダイゼーション温度の算出

T_m = 4℃（GC塩基数）+ 2℃（AT 塩基数）［DIG Easy Hyb中において］
T_{hyb} = T_m − 10℃［DIG Easy Hyb中において］

GC数 = オリゴプローブ中に含まれるGおよびC塩基の数
AT数 = オリゴプローブ中に含まれるAおよびT塩基の数

4. ブロットのストリンジェント洗浄

低ストリンジェンシー洗浄

ハイブリッドのタイプ	バッファー	洗浄の時間と回数	温　度
全て含む	2×SSC, 0.1% SDS	5分間×2回	室温

高ストリンジェンシー洗浄[1, 2]

ハイブリッドのタイプ	バッファー	洗浄の時間と回数	温　度
DNA：DNA	0.5×SSC, 0.1% SDS	15分間×2回	65℃
RNA：DNAまたは RNA：RNA	0.1×SSC, 0.1% SDS	15分間×2回	68℃
オリゴ：DNA	1×SSC（最低でも）[3], 0.1% SDS	15分間×2回	ハイブリダイゼーションに使用した温度. ***ノート：***最適な温度が異なる場合があります.

1 プローブとのホモロジーが100%の哺乳類 DNAに対する条件.
2 常に洗浄用バッファーを適温まで温めてからメンブレンに使用してください.
3 多くの場合, よりストリンジェンシーの高い0.5×SSCを使用します.

5. アルカリホスファターゼ基質の感度

DIGシステムで使用されるアルカリホスファターゼ基質の感度の比較

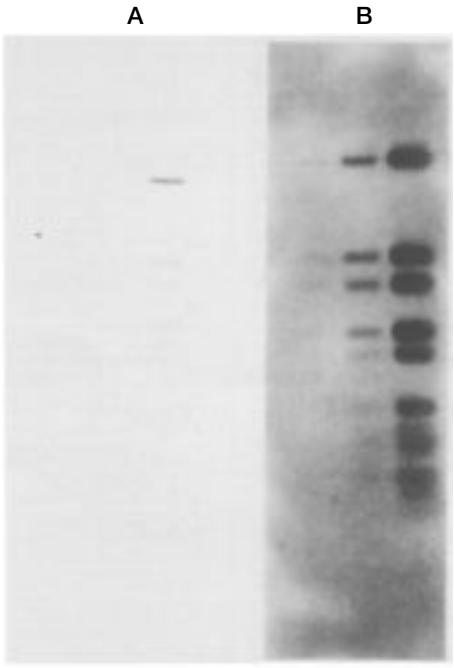
基　質	感　度	アッセイ時間
NBT/BCIP（発色）	● ドットブロット上で0.1 pg DNAを検出	16時間
	● 1 μgヒトDNAのサザンブロット上でシングルコピー遺伝子を検出	
	● ベクターのコピー数や細胞数が少ないライブラリーのスクリーニングにおけるコロニーまたはプラークを検出	
CSPD（化学発光）	● サザンブロットまたはドットブロット上の50 ngヘテロガスDNA中から0.03 pgのホモロガスDNAを検出	< 30分間[2]
	● 0.3 μgヒトDNAのサザンブロット上でシングルコピー遺伝子を検出	
	● ノーザンブロット上で0.1 pg RNAを検出	
CDP-*Star*（化学発光）	● サザンブロットまたはドットブロット上の50 ngヘテロガスDNA中から0.03 pgのホモロガスDNAを検出	< 5 分間[2]
	● ノーザンブロット上で100 ngのトータルRNA中から希少なmRNAを検出（RNAプローブを用いたとき）	15分間[2]

1 最適なハイブリダイゼーションの条件下で得られたデータです.
2 X-線フィルムへの露光時間.

付録 B： DIGシステムのトラブルシューティング

1. 発生しやすい問題と推奨される解決方法

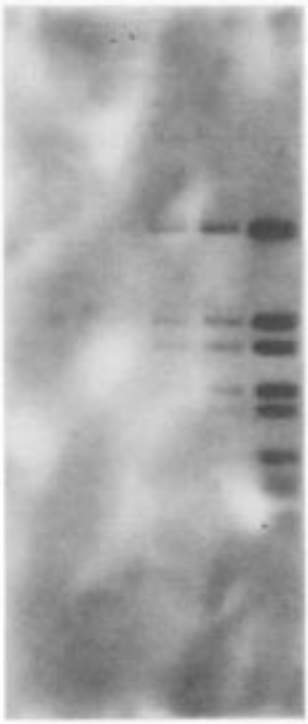
問題 1：シグナルが弱すぎる, またはシグナルが強すぎる



考えられる原因
化学発光アッセイにおける露光時間が短すぎる(A), または長すぎる(B).

解決方法
ブロットをX-線フィルムまたは化学発光イメージャーに露光させる時間を長く(A), または短く(B)します.

問題２：メンブレン全体に高いバックグラウンドを生じる



考えられる原因

- ハイブリダイゼーションに使用したプローブの濃度が高すぎる(最も考えられる原因です).
- テンプレートDNAにコンタミネーションが生じていたため，不純物を含むプローブが調製された.

解決方法

- プローブの濃度を低くします.
- 異なるプローブ濃度で(172ページの付録 B，パート 2 に解説されるように)モックハイブリダイゼーションを行い，最もシグナルが強くバックグラウンドの低い結果をもたらすプローブ量を決定します.
- (ラジオアクティブな解析とは最適条件が異なるため)ブロット 1 枚の解析に，ラベリング反応で得られたプローブを全量使用しないでください.
- プロティナーゼ K 処理や 0.45 μm セルロースアセテート製フィルターによるろ過，あるいは High Pure PCR Product Purification Kitを用いてプローブを精製します.
- フェノール抽出およびエタノール沈殿により，テンプレートを精製します.

問題３：不均一に雲様のバックグラウンドを生じる

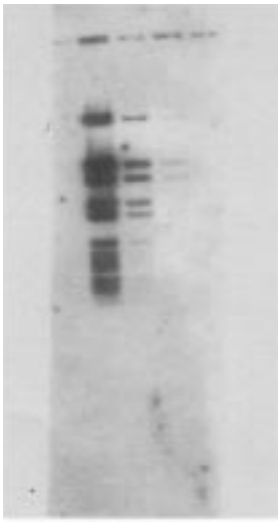
考えられる原因

ハイブリダイゼーション溶液量が不充分であったり，インキュベーション間でのメンブレンの乾燥により，ハイブリダイゼーションにおいてプローブの拡散が不均一になった.

解決方法

- プレハイブリダイゼーション溶液に，プローブを直接加えないようにします.
- プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの間，メンブレンを乾燥させないようにします.
  例えば，プレハイブリダイゼーション溶液を流し捨てる前に，ハイブリダイゼーション溶液をメンブレンに加えられる状態にまで調製しておきます.
- 100 cm^2のメンブレンに対し，最低3.5 mlのハイブリダイゼーション溶液を使用します.
  ノート：インキュベーションにローラーボトルを使用する場合は，ボトル当たり最低 6 mlのハイブリダイゼーション溶液を使用します.
- ハイブリダイゼーションのインキュベーション中，容器を振とうさせます.
  注意：ハイブリダイゼーション用バッグが，ウォーターバスの底に水平に設置されていることを確認してください.

問題 4： 不明瞭なしみ，粒状のバックグラウンドを生じる



考えられる原因

- 化学発光基質が不均一に拡散した. メンブレンをプラスチック製ラップに包んでインキュベーションを行ったことなどが原因と考えられる.
- ハイブリダイゼーションバッグのしわが，メンブレンとX-線フィルムとの不均一な接触を生じさせた.
- 化学発光による可視化の操作中に，メンブレンが乾燥した.

  ノート：顆粒状のバックグラウンドは，ハイブリダイゼーションというより化学発光の操作中にメンブレンの乾燥が生じたことを表しています. ハイブリダイゼーションの間に乾燥した場合は，雲様のバックグラウンドを生じます(問題 3 を参照).

解決方法

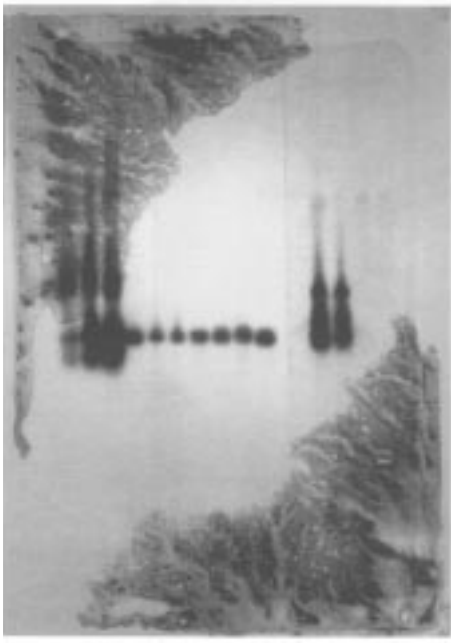
- 化学発光基質を用いたインキュベーションの際，プラスチック製ラップでメンブレンを包まないでください.
- 108ページの第 2 章，セクション 4.1 で解説されている通り，化学発光基質をメンブレンの表面に均一に広げてください.
- X-線フィルムに露光させる前に，ブロットとメンブレンとの間にしわが生じないよう，ピペットを転がしてバッグの表面を平らにします.
- 基質溶液で湿らせたメンブレンを(フォルダーまたはバッグの中へ)きっちりとシールし，インキュベーションやX-線フィルムへの露光を行ってください. シールした部分から液がもれていないかを確認してください.

問題 5：メンブレンの一部にのみ高いバックグラウンドを生じる

考えられる原因 1

(データは，Dr. Bacchetti and Dr. Marusic, McMaster University, Canada のご厚意による.)

化学発光検出の操作中にメンブレンが乾燥した.



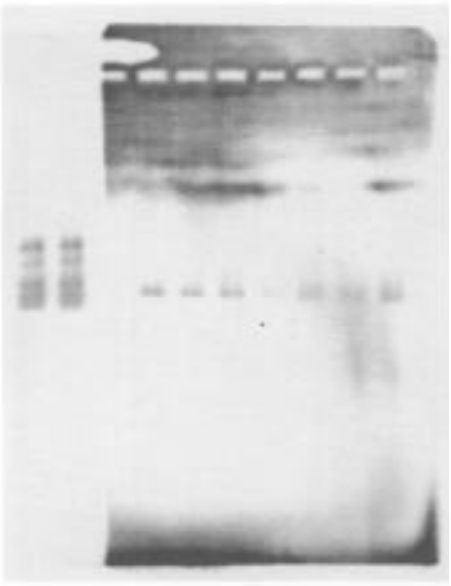
解決方法

- 化学発光基質を用いたインキュベーションの際，プラスチック製ラップでメンブレンを包まないでください. プラスチック製のラップでは密封ができないため，メンブレンを乾燥させるおそれがあります.
- 基質溶液で湿らせたメンブレンを(フォルダーまたはバッグの中へ)きっちりとシールし，インキュベーションやX-線フィルムへの露光を行ってください. シールした部分から液がもれていないかを確認してください.

[問題 5：続き]

考えられる原因 2

(データは, Dr. Bacchetti and Dr. Marusic, McMaster University, Canada のご厚意による.)
メンブレンがブロッキング溶液中で乾燥し, インキュベーションに使用していたトレーの内側に付着した.



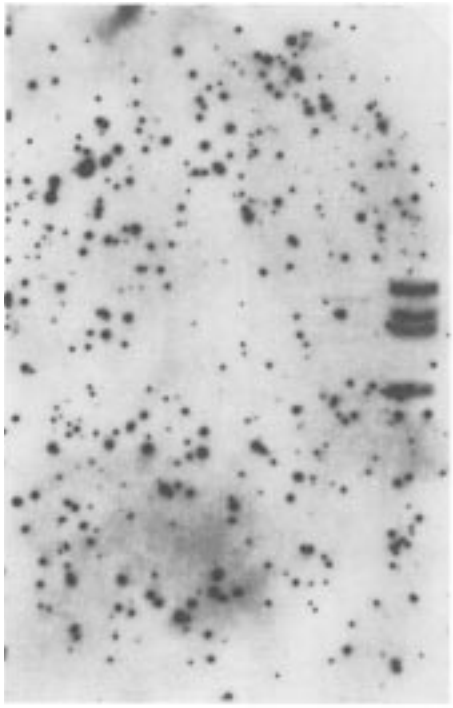
解決方法

- プレハイブリダイゼーション, ハイブリダイゼーションあるいは検出のどの操作段階においても, メンブレンを乾燥させないようにします.
- 各インキュベーションには常に十分な量の溶液を使用し, メンブレンが完全に溶液に浸るようにします.
- インキュベーションの間(特に振とうさせる場合), メンブレンが乾燥したりトレーに付着していないかを適宜確認するようにします.

問題 6：スポット状のバックグラウンドを生じる

考えられる原因 1

抗体に沈殿物が含まれた状態で, メンブレンにアプライした.



解決方法

- 抗体(もともとのバイアル)の調製試薬を, 使用前に必ず10,000 rpmで少なくとも 5 分間遠心します. 抗体を希釈する場合は, 遠心後のバイアルの上澄から少量を取るようにします.
- 抗体のインキュベーションのステップ後に使用する, 検出バッファーにMg^{2+}イオンが含まれていないことを確認してください.

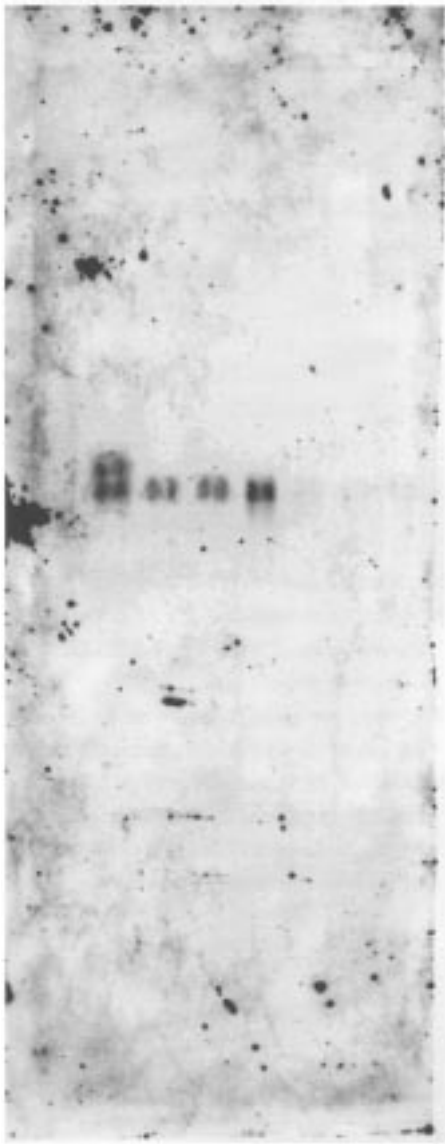
[問題 6：続き]

考えられる原因 2
メンブレンがノンラジオアクティブアッセイに適していない.

解決方法
ロシュ・ダイアグノスティックス社から発売されているポジティブチャージのナイロンメンブレンを使用してください.

[問題 6：続き]

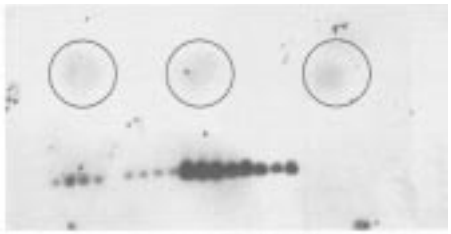
考えられる原因 3
(データは, T. Ruckes, Institute of Virology, Erlangen, Germanyのご厚意による.)
検出操作の前の段階で塩の結晶(20×SSCによる)がメンブレンに焼き付けられた.



解決方法
- ベーキングの前にメンブレンを2×SSCで手短に洗浄します.
- メンブレンをベーキングせず, 代わりにUVクロスリンキングによりDNAを固定し, メンブレンを水で洗います(87ページの第 2 章, セクション 3.1.2.2に解説される).

問題 7：バンドの上に灰色の円形の影を生じる

（データは, Dr. Bacchetti and Dr. Marusic, McMaster University, Canadaのご厚意による.）



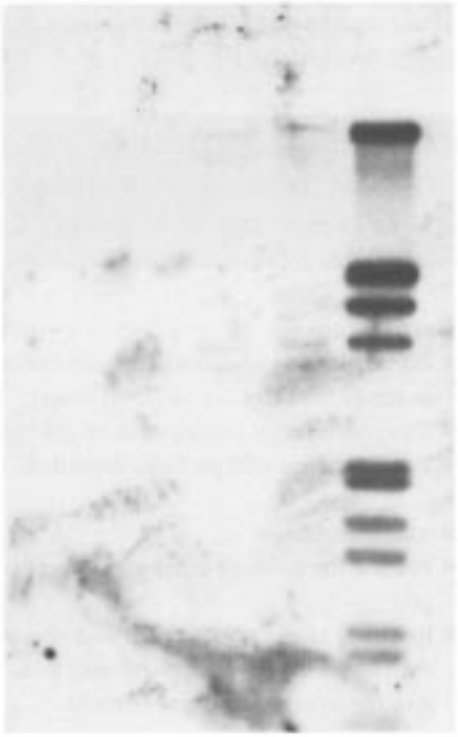
考えられる原因

化学発光基質を加える前に, メンブレンを乾燥させすぎたため, 基質がメンブレン上の数ヶ所で乾燥し, グレーの円形の影を生じた.

解決方法

- 化学発光基質を加える前に, メンブレンを(少しでも)乾燥させないようにします.
- 化学発光基質を加えたら, 直ちにフォルダーやバッグのもう一方のシートでメンブレンをカバーします(108ページの第 2 章, セクション 4.1に解説される).
  微量の基質溶液が乾燥しただけでも, グレーの円形の影を生じる可能性があります(特にCDP-*Star* を使用する場合).

問題 8：メンブレンによってカバーされていない部分で, X-線フィルム上にスポット状のバックグラウンドを生じる.



考えられる原因

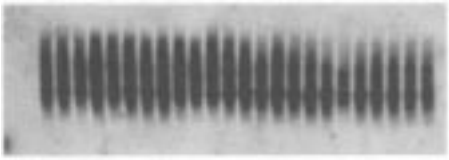
密閉したハイブリダイゼーションバッグの外側が帯電していた.

解決方法

- X-線フィルムに露光させる前に, 密閉したハイブリダイゼーションバッグの表面を, 70%エタノールでふいてください.
- メンブレンを扱う際には, 必ず手袋を着用してください.
- メンブレンを持ち上げる際はピンセットを用い, 決して素手で触れないようにします.
- メンブレンを持ち上げる際は, (ピンセットを用いる場合でも)メンブレンの端を使い, 決して中心部分を持たないようにします.

問題 9：メンブレン上にバックグラウンドは見られないが，レーンを横切るように非特異的なしみ状のシグナルが現れる

（データは，Dr. B. Hengerer, Ciba Geigy, Switzerlandのご厚意による.）



考えられる原因

- プローブが試料中のターゲット以外の何らかの核酸と結合した.
- ゲル上にターゲット核酸が多量にありすぎる.
- ターゲット核酸が部分的に分解している.

解決方法

- ゲルにロードするターゲット量を減します.
- ハイブリダイゼーションの実験に使用する前に，ターゲット核酸を再度分離し，試料が分解されていないか確認します.

問題 10：バンドが拡散する

考えられる原因

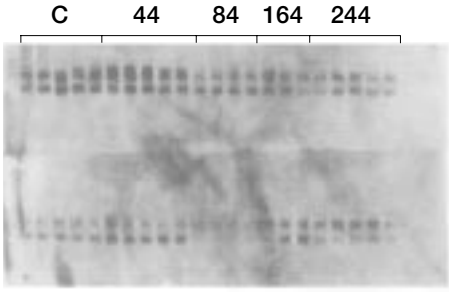
- ブロットトランスファーの操作で核酸のトランスファーが不完全だった.
- ブロットトランスファーの操作中にゲルがつぶされた.
- 吸引トランスファーの操作中にゲルが部分的に乾燥した.

解決方法

- キャピラリートランスファーにおいて，重りの負荷がブロットの面全体に均一にかかっているか，またゲルがつぶされたり，あるいはゆがんだりしていないことを確認します.
- 吸引トランスファーにおいて，吸引が一定であることを確認します. また，吸引の強度がトランスファーに効果的であることも確認します. 強度が効果的でないと，ゲルが不均一に乾燥することがあります.

問題 11：バンドが見られない

（データは，Dr. B. Hengerer, Ciba Geigy, Switzerlandのご厚意による.）



考えられる原因

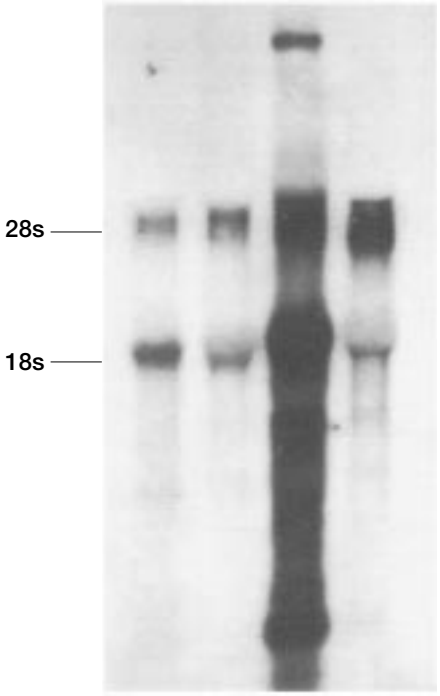
- ブロットトランスファーの過程で，メンブレンとゲルとの間に気泡が入った.
- HClを用いた脱プリン化を行わなかった（> 5 kbのバンドが失われた場合）.

解決方法

- ブロットトランスファーの「サンドイッチ」をセットアップする際，ゲルの表面とメンブレンとの間に生じた気泡を全て，注意深く除去します.
- ゲル上に分子量の大きいDNA（> 5 kb）が存在する場合，ブロットトランスファーを開始する前にゲルを0.25 M HCl で10～20分間処理します．この操作によりDNAが脱プリン化されるため，その後のアルカリ変性ステップでDNAが断片化され，容易にブロットトランスファーされます（詳細については，87 ページの第 2 章，セクション 3.1.2.2を参照ください）.

問題 12：ノーザンブロットで，非特異的な rRNAのハイブリダイゼーションシグナルが見られる

（データは，M. Block, University of Hamburg, Germanyのご厚意による.）



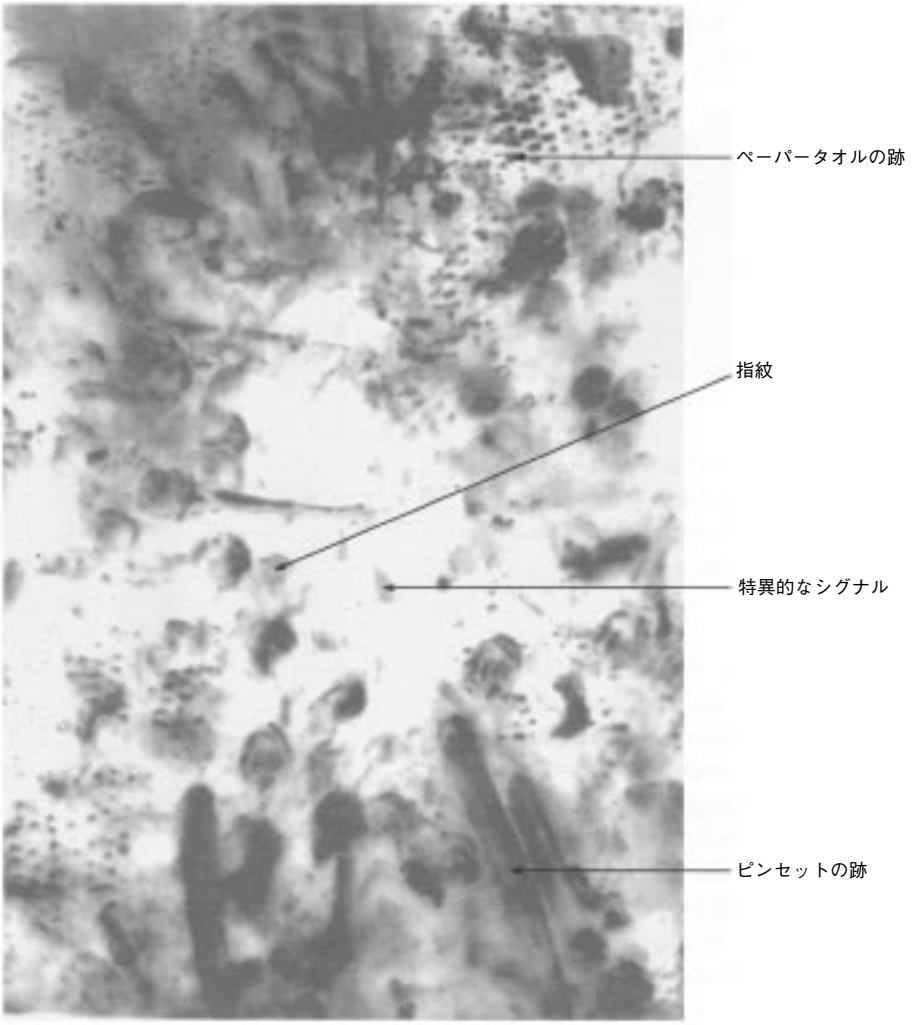
考えられる原因

ラベルされたプローブに目的でないRNAや染色体DNAのシークェンスが含まれていたため，これが試料中のリボゾームRNAに結合した.

解決方法

- 染色体DNAおよびRNAのコンタミネーションが無いプラスミドDNA調製物から，ラベルするプローブを調製します．プラスミドをHigh Pure Plasmid Isolation Kitで精製します.
- DNAプローブの代わりに，トランスクリプションによりラベルされたRNAプローブを調製します（68ページの第 2 章，セクション 2.3に解説される）.
- 薦められる量を上回るターゲットRNAをゲルにロードしないでください．DNAプローブに対しては，5 μgのトータルRNAまたは500 ng の mRNAがお薦めです. RNAプローブに対しては，1 μg のトータルRNAまたは100 ngのmRNAがお薦めです.

問題 13：メンブレンに複合的なバックグラウンドや汚れを生じる



考えられる原因

- 操作中，メンブレンの取り扱い上の注意を怠った．
  ノート：メンブレンの表面を触ったり，引っかいたり，ガーゼでこすったりすると，それらは化学発光検出の操作によりメンブレン上に目で見える形で現れます．
- 以前にラジオアクティブにラベルされたプローブのみを用いてハイブリダイズされたブロットに，DIGラベルされたプローブを再ハイブリさせた．
  ノート：上記のバックグラウンドの原因となる「跡」はいずれも，ラジオアクティブな検出操作では目に見えません．

解決方法

- DIGの操作では，ブロットの取り扱いを極めて慎重に行ってください．メンブレンの端のみを手袋またはピンセットのみで扱います．メンブレン上の実験試料がブロットされている部分には，**絶対に**触れないでください．
- DIGの操作を初めて行う場合は，常に新しく調製したブロットを用いて実験を始めてください．以前にラジオアクティブな検出操作に使用したブロットを再使用しないでください．ラジオアクティブの操作中に生じたメンブレンの目に見えない損傷が，DIGの操作で可視化される場合があります．

2. シングルコピー遺伝子の検出をより簡単に最適化するには

このセクションでは，数多くの最適化のステップを踏まずに良好な結果をもたらすDIGラベルされたプローブの確実性を評価するにはどうすれば良いかについて解説しています．この最適化のプロセスの効率について説明するため，ランダムプライムドラベルされたプローブの「問題」となった実例を使用しました．問題となった実例には，実際に4種類のテンプレートがあり，それらは全てシングルコピー遺伝子に関連するRFLPを認識するプローブを合成するためにデザインされたものでした．これらのテンプレートから生成されるラベルされた 4 種類のプローブは全て，ハイブリダイゼーション用メンブレン上に高いバックグラウンドを生じることが問題でした．
DIGラベルされたプローブの最適化を図るため，以下のステップで操作を行いました．

1. 直接検出法(図 A)により，プローブのラベリング効率を決定しました．
2. ステップ 1 の結果から，感度が最も高いプローブ(プローブ 2)を選びました．プローブ 2 を異なる濃度で"モック"ハイブリダイゼーションに用い，バックグラウンドが最少になるプローブ濃度をつきとめました(図B)．
3. 予想されるバックグラウンドを低くするため，プローブをセルロースアセテート製フィルターでろ過しました(図 B)．
   注意：プローブがニトロセルロースに不可逆的に結合するため，プローブのろ過にニトロセルロース製メンブレンを使用しないでください．

この最適化の操作の効果を調べるため，最適化されたプローブを，実際にサザンブロット実験に試用しました(図 C)．ブロットから良好な結果が得られ，最適化の操作がうまくいったことが示唆されました．この操作はあなたのお手元にあるDIGラベルされたプローブに対しても用いることが可能です．

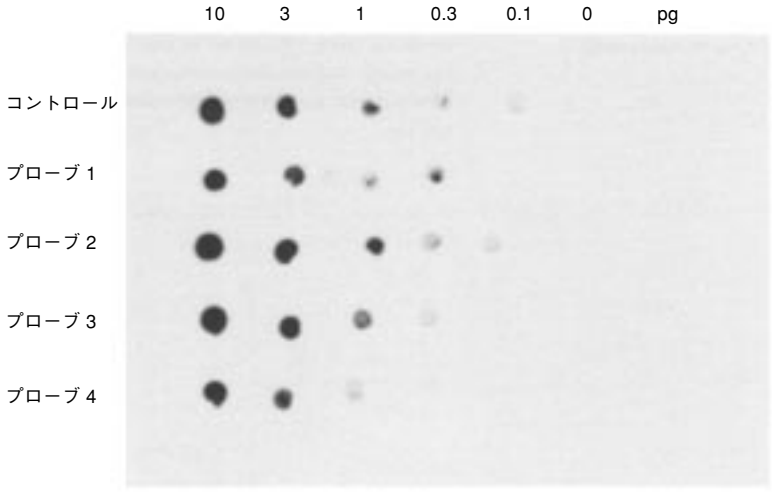


図 A. 単一遺伝子座RFLPを検出する 4 種類のプローブの最初の評価. DIGラベルされたプローブのラベリング効率を直接検出アッセイ(第 2 章, 79ページ)により確認した．

結果と結論：プローブ 2 が最大の感度を示した(0.1 pg DNA)．プローブ 1 と 3 の感度は，0.3 pg で，これらもシングルコピー遺伝子の検出には十分な量である．プローブ 4 の感度はわずか 1 pgだった．したがって，プローブ 1 ～ 3 はシングルコピー遺伝子の検出に使用するのに十分な感度を示した．プローブ 4 はシングルコピー遺伝子の検出に十分な感度を示さなかった．

2. シングルコピー遺伝子の検出をより簡単に最適化するには

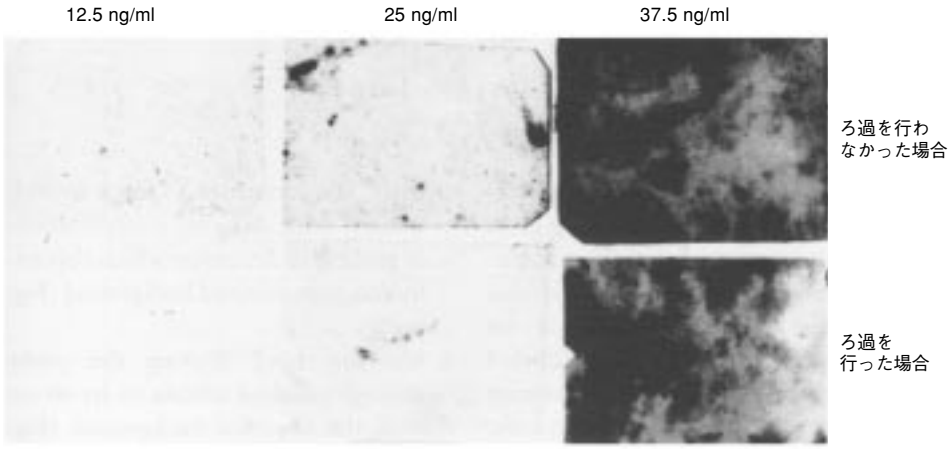


図 B. 最も感度の高いDIGラベルされたプローブを用いた モックハイブリダイゼーション. 一連の標準的なハイブリダイゼーション反応のプローブとしてDIGラベルされたプローブ 2（図 A）を使用した．ただし，実際にそれぞれのテストには，ターゲットDNAを含まない「ブロットメンブレン」が使用された．この実験では，プローブの非特異的な結合によるバックグラウンドの形成がテストされた．DIG Easy Hyb中にさまざまな濃度で希釈されたプローブを，モックハイブリダイゼーションに使用した．それぞれに，ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件が用いられた．上段の一連の写真は，異なる濃度のプローブについて前処理を行わなかった場合の結果を示している．下段の一連の写真は，同じプローブを0.45 μmのセルロースアセテート製フィルターでろ過した後に異なる濃度で使用して得られた結果である．各実験に用いられた3通りのプローブ濃度は，スタンダード濃度（25 ng / ml, 中央のパネル），0.5 × スタンダード濃度（12.5 ng / ml, 左側のパネル），1.5 × スタンダード濃度（37.5 ng / ml, 右側のパネル）である．

結果および結論：バックグラウンドを生じないプローブ濃度の範囲は非常に狭いものでした．プローブ濃度が低いもの（左側のパネル）とスタンダード（中央のパネル）から生じるバックグラウンドは許容範囲内でしたが，対照的にプローブ濃度の高いもの（右側のパネル）からは非常に高いバックグラウンドが生じました．プローブ濃度の50%あるいはそれ未満の範囲で変えることが，バックグラウンドの有無（許容範囲か否か）の差に作用しました．このバックグラウンドは，明らかにハイブリダイゼーション反応中のプローブ濃度が過剰であったことのみに起因しています．

上段と下段のパネルの比較により，ろ過がバックグラウンドをさらに低く抑えることを示しています．ろ過していないプローブ（上段の 3 枚のパネル）は，斑点状のバックグラウンドを多く生じています．この「こしょう粒のようなスポット状の」バックグラウンドは，ラベリングに使用されたテンプレートの純度が低いことにより生じています．ラベルされたプローブを単にセルロースアセテート製フィルターでろ過することで，コンタミネーションをある程度除去することが可能です（下段の3枚のパネル）．

結果として，プローブ 2 を25 ng / mlというスタンダード濃度より高濃度で使用しないこと，またプローブを使用前にセルロースアセテート製フィルターでろ過することが必要です．

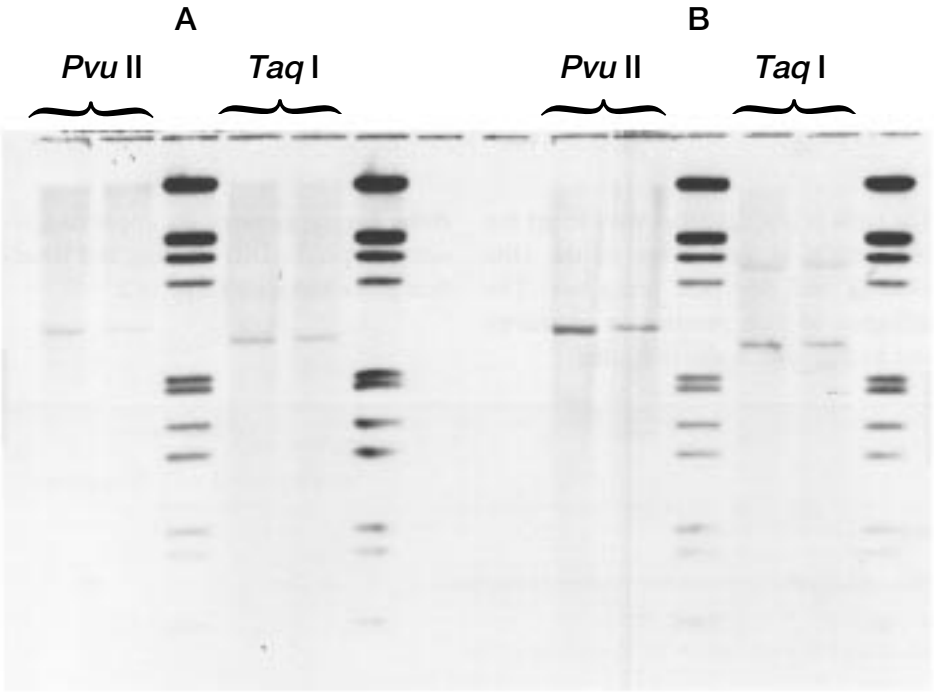


図 C. 最も感度の高いDIGラベルされたプローブを用い最適条件下で行われたサザンブロット. ろ過されたDIGラベルプローブ 2 を使用し，サザンブロット上のシングルコピー遺伝子を検出した．ターゲットDNAには，ヒト血液由来のDNA（パネルA）またはHeLa細胞由来DNA（パネル B）のいずれかを用いた．それぞれの抽出源について，5 μgまたは 2.5 μgのDNAを含む試料をパネル上に示す制限酵素（*Pvu* II または *Taq* I）により消化し，1 %アガロースゲル分離した後，ポジティブチャージのナイロンメンブレン（ロシュ・ダイアグノスティックス社）へトランスファーした．試料の各セット間に，DIGラベルされたDNA分子量マーカーをブロットした．先（図 B）に決定された至適化のガイドラインに従い，プローブ 2 をセルロースアセテート製フィルターでろ過し，25 ng / ml 濃度でハイブリダイゼーションバッファーに加えた．ハイブリダイゼーションおよび化学発光検出には，弊社の標準的なプロトコールを使用した．

結果および結論：全ての試料から，目的とするシングルコピーのRFLPが明瞭に可視化されています．バックグラウンドは非常に低く抑えられています．つまり，図 A および B で解説される 3 -ステップの至適化ステップが効果を示し，最適化されたプローブが実際の実験条件下で良好な結果をもたらしています．この「問題となったプローブ」は当初，ヒト血液由来DNAをターゲットとしていました．ここで解説したプローブ調製における至適化により，当初の問題を克服し良好な結果をもたらすことが可能です．

付録C： DIGラベリングおよび検出結果を改善するには

DIGラベリングおよび検出操作の各段階で最良の結果を得るための方法について，下表に解説します．
感度やバックグラウンドに対する実践上の効果についても概説します．

ノート：DIGラベリングおよび検出に関する特定の操作で，結果を改善させるための注意点については第 2 章を参照ください．

最良の結果を得るために注意すること	改善の対象 バックグラウンドに与える影響	感度に与える影響
1. 一般的な予防策		
常に滅菌条件下で操作を行い，コンタミネーションやヌクレアーゼを防ぐようにします．例えば， ● DIGシステムの溶液をオートクレーブ滅菌します．滅菌した後に溶液にTween 20を加えます． ● 滅菌されたピペットチップを使用します． ● SDSを含む溶液をフィルター滅菌します．	++	++
清潔なインキュベーション用トレーを使用します．トレーはそれぞれ使用する前に汚れをしっかりと洗浄し，すすぎます． ***ノート：***ノーザンブロットでは，洗浄および検出の全てのステップで滅菌済みのガラス製トレーを使用します．	++	++
メンブレンの取り扱いにはパウダーフリーの手袋を着用します．	+	
清潔なピンセットを用い，メンブレンの端だけを持って取り扱います．	+	
DIGシステムに慣れるため，DIGシステムのキットに含まれるコントロールを用いてシステムの操作を行います．	+	
2. DIGラベリング		
PCRラベリング以外の全てのラベリング方法において，できる限り高純度のDNAテンプレートを用いて操作を始めてください．テンプレートの精製には，CsClを用いた密度勾配による精製方法が理想的です． ***ノート：***PCRプライマーが特異的であるため，PCRラベリングでは純度の低いテンプレートからでも適切なプローブが合成されます．	+	+
ラベリングのテンプレートとしてクローンされたシークェンスを使用する場合，ラベリングの前にテンプレートからできる限りベクターを除去するようにします．ベクターのシークェンスがラベルされると，クロス-ハイブリダイゼーションや非特異的なハイブリダイゼーションによるシグナルが生じることになり面倒です． ***例：***ラベルされる目的のインサートにできる限り近接した部位を切断する制限酵素を用いてベクターを消化します．	+	
ラベリングによる副産物（PCRラベリングによる二次的な増幅産物など）が多量に生成される場合，ラベリング反応中のテンプレートの量を減らします．	+	
アガロースゲルから分離したDNAフラグメントをテンプレートとして使用する場合，分離されたフラグメントをラベリング反応に使用する前に精製します（Roche社のAgarose Gel DNA Extraction KitやSchleicher and Schuell社のElutipsなどを用いて）．		+

最良の結果を得るために注意すること	改善の対象 バックグラウンドに与える影響	感度に与える影響
テンプレートの濃度決定に吸光度を使用する場合，吸光度から濃度を算出する上でDNAに対して適切な変換値を使用しているかどうかを確認します． ***例：***オリゴヌクレオチドでは，1 A_{260} ユニット = 33 μg オリゴヌクレオチドに相当すると推定しています．しかし，オリゴヌクレオチドの塩基構成は吸光度に著しく影響します．ヌクレオチドの真の吸光度は，各塩基の吸光度の合計ということになります．		＋
DNAに分子量の大きなDIG-dUTPを付加させることは，一般にDNAの酵素による複製反応の速度を低下させます．したがって，ラベリング反応のタイプに応じて最適なDIG-dUTP：dTTPの比率が存在します（ポリメラーゼの反応速度低下を最小限にしながら，最適な頻度でDIGを挿入させることが可能）．この比率は方法により様々です．一般に，目的の方法に適したラベリング用キットで供給されるDIG-dUTP：dTTP混合液のみを使用します．他の比率のラベリング混合液を**代用しないでください．**		＋
ラベリング反応をプロティナーゼKで処理することが，感度を高め，バックグラウンドを低下させる場合があります． ***操作の概要：***0.1 容量のプロティナーゼ K ストック（20 mg/ml）を加えます．37℃で 2 時間インキュベートします．直接,反応産物をハイブリダイゼーションに使用します．	＋	＋
一般に，ハイブリダイゼーションの前にラベルされたプローブから未反応のDIGヌクレオチドを取除く必要はありません． ***例外：***プローブを*in situ* ハイブリダイゼーションに使用する場合は，プローブを使用する前に，取り込まれなかった未反応のDIGヌクレオチドを除去する必要があります．		
ノーザンブロットの実験に使用するアンチセンスRNAプローブをラベルする場合，トランスクリプションに適切なDNA鎖をしているかを確認します．	＋	＋
3. 電気泳動とブロッティング		
一般的な電気泳動のヒント：簡便性を最大にするため，DIGラベルされた分子量マーカーをゲルの1つのレーンにロードします．このマーカーは，検出操作により可視化され，検出する目的のバンドの分子量の算出を可能にします． ***ノート：***ゲルに乗せる分子量マーカーの必要量は，ハイブリダイゼーション産物の予想されるサイズに依存します．目的のハイブリッドと同程度のサイズのバンドが明瞭に現れるよう，十分な量のマーカーをロードしてください．		＋
RNAの電気泳動：RNA試料を分離する際，2%または 6%のいずれかの濃度のフォルムアルデヒドを含むゲルを使用することができます．ただし，2%フォルムアルデヒドを含むゲルの方が解像度の高い（シャープな）バンドになることが確認されています．		＋
RNAの電気泳動：プラスミドのポリリンカー部位がリボゾーム 28s- および 18s-RNAシークェンスとホモロガスな場合があります． したがって，ラベルされたプローブが，これら発現量の多いRNAを含む試料中において，特異的だが不要なシグナルを生じることがあります． ターゲットのRNA試料中のリボゾームRNAの量を減少させることにより，この現象を防ぐことが可能です．	＋	＋
RNAの電気泳動：ゲルでRNAを分離する方法はたくさんあります． 弊社では，取り扱い易く信頼性のあるフォルムアルデヒド / MOPSゲルをお薦めします．		＋

最良の結果を得るために注意すること	改善の対象 バックグラウンドに与える影響	感度に与える影響
RNAの電気泳動：RNA試料は，フォルムアミド/フォルムアルデヒド溶液中で変性させる必要があります． ***ノート：***試料をグリオキサル変性した後，リン酸バッファーゲルで分離する方法も使用可能です．しかし，グリオキサルはフォルムアミド/フォルムアルデヒドに比べて使用しにくいことが分かっているため，弊社では使用を薦めません．電気泳動の成功は，グリオキサルの品質とグリオキサルの使用直前の脱イオン化に大きく依存しています．	＋	＋
3.1. DNAをトランスファーする前にアガロースゲル中で前処理する． 特定のサイズや構造をもつDNAは，トランスファー効率を高めるため，ゲル中で酸またはUV光により前処理する必要があります． 例えば，5 kbを上回る大きさのDNAターゲットやスーパーコイル構造のプラスミドは，トランスファー前に断片化させる必要があります． ***コメント：***分子量の小さい（5 kb以下の）DNAターゲットをトランスファーまたは検出する場合は，トランスファー前に処理を行う必要がありません．これに対して，分子量の非常に大きい（Mb）フラグメントやスーパーコイル構造のプラスミドでは，HClとUV処理の両方を行う必要があるかもしれません．それぞれの正確な操作条件は，実験により決定する必要があります． 酸を用いた前処理（脱プリン化）：ゲルを0.25 M HClを用いて10～20分間処理します（哺乳類由来のDNAでは10分以内，植物由来のDNAでは20分以内）． ***Tip：***HClを用いた処理をあまり長時間行わないでください．処理が長すぎると，DNAが非常に小さなフラグメントに分解され，トランスファーの間に失われてしまいます． UV光を用いた前処理：UVトランスイルミネーターを使用してゲル中のDNAの断片化を行います． ***ノート：***トランスイルミネーターごとに，適切な照射時間を実験的に決定する必要があります．		＋
3.2. 変　性 アルカリトランスファーを行わない場合は，0.5 M NaOH / 1.5 M NaClを用いてゲルを15分間×2回処理し，トランスファー前にゲル中の二本鎖DNAを変性させます． ***ヒント：***DIGラベルされたDNAマーカーを使用している場合は，変性溶液中でのインキュベーションを15分間×2回より長く行わないでください． アルカリ条件に長く置くと，マーカーからDIGがはがれてしまいます．		＋
3.3 中　和 特にDNAをニトロセルロースメンブレンにトランスファーする場合は，トランスファー前にゲルの pH を確認します．ゲルのpHを確認するには，ゲルのDNAを含まない部分に pH 試験紙を押し当てた後，試験紙を観察します． ***ノート：***トランスファー中にゲルの pH が > 9 になると，ニトロセルロースメンブレンが黄色に変色し，ハイブリダイゼーション中にぼろぼろと破れてしまいます． ニトロセルロースに比べて，ナイロンメンブレンの方が高い pH に対して耐久性があります．		＋

最良の結果を得るために注意すること	改善の対象 バックグラウンドに与える影響	感度に与える影響
3.4 キャピラリートランスファー		
● アガロースゲルからメンブレンへ核酸をトランスファーする方法はたくさんあります. 感度を最大にするお薦めのトランスファー法は： キャピラリーブロット > 吸引ブロット > ドライブロット.		＋
● 弊社では,トランスファーには弊社のナイロンメンブレン, ポジティブチャージの使用を特にお薦めしています. このメンブレンは前処理の必要がなく, DIGシステムのためにデザインされています. これに対して, ニトロセルロースメンブレンはトランスファーの前に蒸留水と20 × SSCに浸す必要があります.	＋	＋
● メンブレンの取り扱いには，常に細心の注意を払います．常にパウダーフリーの手袋を着用し，メンブレンに触れる際はピンセットを用います．メンブレンの端を扱うようにします．メンブレンに指紋を残さないでください.		＋
● **ノーザンブロットのための特別なtip：** トランスファーの前に，滅菌（オートクレーブ）済みのトランスファーバッファー中にゲルを10分間浸します. この操作により,トランスファーを阻害する可能性のあるゲル泳動バッファーの組成（フォルムアルデヒドなど）が除去されます. ***ノート：***臭化エチジウムによる染色は，RNAのトランスファーを阻害しません.		＋
● ゲルとメンブレンとの「サンドイッチ」を形成する際, 清潔なピペットをメンブレン上で軽く転がし，ゲルとメンブレンとの間の気泡を全て取り除きます.		＋
● ゲルの周辺部分にぐるっとパラフィルムを置き, ゲルの下部のWhatman紙と上部のブロッティング用紙とが直接接触するのを防ぎます.		＋
● トランスファーバッファーの流れが，ゲルの周囲を通らず，全てゲルを通過していることを確認します. ゲルの下部のWhatman紙やトランスファーバッファーに触れないようにペーパータオルの束を設置します．このブロッティング用紙は，完全に湿ってしまったら交換します.		＋
● 20 × SSCをトランスファーバッファーに使用します. 非常に分子量の大きなDNAがトランスファーされてしまうため, 10 × SSCは使用しないでください.		＋
● ブロットの「サンドイッチ」の一番上に置く重りを，ゲルのサイズに応じて調整します. ミニゲルには 200 g，20 × 20 cmのゲルには最大 500 g の重りをお薦めします.		＋
● トランスファーの後，ゲルを臭化エチジウムで染色し，目的の核酸が全てトランスファーされていることを確認します.		＋
3.5 固　定		
ハイブリダイゼーションの前に，核酸をメンブレンに固定します．メンブレンのベーキングまたはUV光による架橋を利用します. **ベーキング：**メンブレンの大部分に対して，80℃で 2 時間ベークします. 弊社のナイロンメンブレンでは，120℃で30分間ベークします. **UV：**UVトランスイルミネーターを使用し，実験的に適切な照射時間を決定します. 変法として，市販の架橋用装置（Stratalinkerなど）を使用し，その装置の標準的なプログラムを用います（ほぼどのプログラムを使用しても，大部分で良好な結果が得られます）.	＋	＋
4. プレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーション		
RNaseはメンブレンに結合した一本鎖RNAを分解することを念頭に置きます. ノーザンブロットを扱う場合は, 常にRNaseフリーの条件下でプレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションを行ってください.		＋

最良の結果を得るために注意すること	改善の対象 バックグラウンドに与える影響	感度に与える影響
4.1. プレハイブリダイゼーション		
● **プレハイブリダイゼーションからハイブリダイゼーションまでの間，メンブレンを乾燥させないように注意します.**	++	
● DIG Easy Hybは，DIGシステムのアプリケーションにおいて最良のバッファーです.	+	+
● DIGラベルされたプローブに対するブロッキング試薬の使用濃度は1%です. 滅菌済みブロッキング試薬の10%ストック溶液を使用して，プレハイブリダイゼーション溶液を調製します.	+	
● 変性済みの魚精子DNAや酵母RNA（50 μg/ml）をプレハイブリダイゼーション溶液に加えることができますが，これはアプリケーションの大部分で必要とされません.		
● プレハイブリダイゼーション溶液の量が十分であること確認します. 例えば，ローラーボトルでプレハイブリダイゼーションを行う場合，ボトル1本当たり最低 20 mlのプレハイブリダイゼーション溶液を使用します.	+	
● ハイブリダイゼーションに使用する温度で，最低30分間のプレハイブリダイゼーションを行います.	+	
● プレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションの間，DIG Easy Hybバッファーから放出されるアンモニアによりインキュベーションのpHの変化を防ぐため，容器を密閉する必要があります.	+	+
● シール式のバッグを使用する場合，プレハイブリダイゼーションの間バッグを穏やかに振とうさせます.	+	
● プレハイブリダイゼーションバッファーは保存して数回再利用することが可能です.		
4.2 プローブを用いたハイブリダイゼーション		
● ランダムプライムドラベルされたプローブを用いてバックグラウンドを可能な限り低くするために，プローブとDIG Easy Hybとの混合液をメンブレンに加える前に常に0.45 μmのセルロースアセテート製フィルターでろ過します. **注意：**ブロッキング溶液を含むハイブリダイゼーションバッファーは，フィルターの孔を詰まらせるため，ろ過しないでください.	+	
● それぞれのプローブとターゲットに応じて，常に最適なハイブリダイゼーションの条件を実験的に決定してください.	+	+
● プローブの濃度は重要です. プローブが多すぎると，余分なプローブがメンブレンに非特異的に結合することがあります. また，プローブが少なすぎると，反応の感度が低下します. ***ノート：***本書に示されるプローブの濃度は，ルーチンで行われる実験アプリケーションの大部分で活用することが可能です．特に重要な実験では，モックハイブリダイゼーションにより最適なプローブ濃度を決定することをお薦めします（付録B，パート2を参照）.	+	+
● 本書にリストされるバッファーおよびプロトコールは，DIGシステムを実際に使用して最適化されたものです.しかし,それ以外で確立されたハイブリダイゼーションバッファーやプロトコールも，DIGシステムに使用することが可能です.	+	+
● DIGラベルされたプローブは，最低1年間安定です．ハイブリダイゼーションバッファー中で保存した場合，DIGラベルDNAプローブは数回（通常3～5回）再利用することができます.		

最良の結果を得るために注意すること	改善の対象 バックグラウンドに与える影響	感度に与える影響
4.2.1. プローブの変性		
● ハイブリダイゼーション溶液に加える前に，必ずDNAプローブおよびRNAプローブを変性させます． ***ノート：***プローブを再利用する（DIG Easy Hyb中で）場合，溶液を68℃で10分間加熱し（沸騰させないこと）プローブを変性させてから使用します．		＋
● オリゴヌクレオチドの変性は，二次構造を生じると予想される場合にのみ必要です．		
● ハイブリダイゼーション溶液にフォルムアミドを含む場合，脱イオン化したフォルムアミドのみを使用してください．	＋	＋
4.2.2. ローラーボトル内でのハイブリダイゼーション		
● ボトル当たり最低 6 ml のハイブリダイゼーション溶液を使用します．必要に応じて容量を増やしてください．	＋	＋
● ローラーボトル内のハイブリダイゼーション温度を注意深くチェックしてください．インキュベーション用オーブン自体の温度がボトル内部の温度と同じである必要はありません．ハイブリダイゼーションの前に，ボトルに水を満たし，温度計で水温を測定して温度をチェックします．	＋	＋
4.2.3. シールされたバッグ内でのハイブリダイゼーション		
● メンブレン 100 cm^2 当たり最低 3.5 ml のハイブリダイゼーション溶液を使用します．十分な量のプローブを使用する場合は，溶液を 100 cm^2 当たり最低 5 mlまで増やしても構いません．	＋	＋
● バッグをシールする前に，気泡を完全に取り除きます．	＋	＋
● バッグの全側面が完全にシールされたことを確認します．ハイブリダイゼーション中に溶液が漏れると，メンブレンを乾燥させる可能性があります．	＋	＋
● シールされたバッグを適切なハイブリダイゼーション温度に設定されたウォーターバス中で穏やかに振とうさせます．ウォーターバスの底にメンブレンを水平な状態に設置してください．	＋	＋
4.2.4. テール付加させたオリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションのための特別なTip		
● テール付加させたオリゴヌクレオチドプローブを用いる場合，0.1 μg/ml のポリ[A]をプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション溶液に加え，非特異的なハイブリダイゼーションを防ぎます．		＋
● 5 μg/ml のポリ[dA]をプレハイブリダイゼーション溶液に加えると，ブロッキング効果を高めることができます．		＋

最良の結果を得るために注意すること	改善の対象 バックグラウンドに与える影響	感度に与える影響
4.3. ノーザンブロットのハイブリダイゼーションのための特別なTip		
● 常に滅菌, RNaseフリーの条件下で実験を行います. メンブレンに固定した一本鎖RNAおよび二本鎖RNAハイブリッドは, それぞれ特異的なRNaseにより分解されます.	＋	＋
● ノーザンハイブリダイゼーションに最適なバッファーはDIG Easy Hybです. また，第 1 章のセクション 6 にリストされる高SDSバッファーは，代わりとして使用することが可能です．DIG Easy Hyb以外のバッファーを使用する場合は，バッファー中に50%フォルムアミドが含まれていることが必要です.	＋	＋
● RNAターゲットの検出には，DNAプローブよりもRNAプローブの方がより感度が高いので，できる限りRNAプローブを使用するようにします.		＋
● RNAプローブを使用する場合，RNaseのコンタミネーションにより生じる不満足な結果を避けるため，ready-to-useの DIG Wash and Block Buffer Set（Cat. No. 1 585 762）を共に使用することをお薦めします.（ブロッキング溶液を粉末から調製する場合など，バッファー類を自家調製する際にRNaseの混入が起こりやすくなります.）	＋	＋
● ラベルされたRNAプローブの大部分には,ベクターのシークェンスが全く含まれません. しかしテンプレート調製時に使用する制限酵素により，プローブに若干のマルチリンカー領域が含まれる場合があり，これが不要なバックグラウンドをもたらすことがあります.	＋	
● RNAプローブを使用する場合，最終的なストリンジェント洗浄の後にRNase Aによる洗浄ステップを加えることで，バックグラウンドを低くすることが可能です. ***操作：***100 μg / ml のRNase Aを含む10 mM Tris / 5 mM EDTA / 300 mM NaCl, pH 7.5の溶液を調製します．ブロットをこのRNase A洗浄溶液中で，室温にて30〜60分間洗浄します. ***注意：***RNase Aの中には，二本鎖に特異的なRNaseが含まれることがあり，これがメンブレン上のハイブリッドを分解する可能性があります. これら二本鎖特異RNaseを検出するには，RNase A 溶液をMS2 RNAを用いてインキュベートします. 変性アガロースゲル上で産物を未処理のMS2 RNAと比較して解析します. MS2 RNAは部分的に二本鎖構造をしています．RNase A 溶液に二本鎖特異RNase活性が無い場合，MS2 RNAの二本鎖部分は分解されずに保持されているはずです.	＋	＋
● RNAプローブを含むハイブリダイゼーション溶液の保存および再使用はお薦めしません.	＋	＋
4.4. コロニーおよびプラークハイブリダイゼーションのための特別なTip		
● ハイブリダイゼーションを始める前に，細胞のデブリスなどの残渣をメンブレンから完全に取り除くことが**必要です**．詳細は，第 2 章，セクション 6.1を参照ください.	＋	＋
● 調製されるプローブには，ベクターのシークェンスが含まれないようにします.	＋	＋

最良の結果を得るために注意すること	改善の対象 バックグラウンドに与える影響	改善の対象 感度に与える影響
4.5 ハイブリダイゼーション後の洗浄		
● アプリケーションのために最適な洗浄条件を実験的に決めます. ***ノート：***本書にリストされるストリンジェント洗浄は，ターゲットDNAに対して100%ホモロガス，かつ50%のGC含有率をもつプローブに適切な条件です.	＋	＋
● ジェノミックのハイブリダイゼーションでは，0.5×SSCを用いた洗浄をお薦めします. しかし，ストリンジェンシーを高める必要がある場合もあります（0.1×SSCの使用など）.	＋	＋
● 洗浄中は，トレーをよく振とうさせてください.	＋	
● ブロットを洗浄する前に，溶液を洗浄に使用する温度まであらかじめ温めておきます.	＋	
● 洗浄や抗体のインキュベーションには，ボトルを使用しないでください.	＋	
● ブロッティングメンブレンが完全に沈む程度に十分な量の洗浄溶液を使用します. メンブレンがようやく溶液に覆われる量では不充分です. また，インキュベーションの間にメンブレンどうしが重なったり，くっついたりしないよう，十分な量の洗浄溶液を使用するよう注意します.	＋	
5. 免疫検出		
● 滅菌条件下で実験を行います.	＋	
● 常に新しい清潔なトレーを使用します.	＋	
● 発色または化学発光を展開させる以外は，全ての検出操作のステップでメンブレンを振とうさせます.	＋	
● 抗体を 4℃で保存します.	＋	
● 抗体溶液は使用する直前に新たに希釈して調製します．まずもとのバイアルを10,000 rpmにて最低 5 分間遠心し，その上清から抗体をピペットで採取して，新しい抗体溶液を調製します.	＋	
● ブロッキングおよび洗浄のステップを延長することは可能ですが，抗体のインキュベーションは延長しないでください.	＋	
● 非特異的なバックグラウンドの問題がある場合，ブロッキング試薬の濃度を５％まで高くすることが可能です.	＋	
● 抗体溶液でのインキュベーションの後，ブロットを常に新しい清潔なトレーに移して操作を行ってください.	＋	
● 発色基質を使用する場合，使用する直前に新たに希釈して調製します.	＋	
● 化学発光基質を使用する場合，抗体を 1：10000 に希釈する必要があります. CDP-*Star* を用いる反応では，さらに抗体を 1：20000 に希釈して使用することができます.	＋	
● 化学発光基質を取り扱う際，滅菌操作のテクニックを使用し，ホスファターゼの混入を防ぎます.	＋	
● 発色反応のインキュベーションは，遮光し振とうせずに行います. ***ノート：***化学発光基質をメンブレンに使用する場合は，特に遮光する必要はありません.	＋	

最良の結果を得るために注意すること	改善の対象 バックグラウンドに与える影響	感度に与える影響
● 同一のブロットを，化学発光検出した後に発色検出することが可能です． ***操作：***化学発光検出が完了した後，検出バッファーを用いて 5 分間メンブレンを洗浄し，化学発光基質を取り除きます．それから発色基質を加えます．メンブレンの裏側のバックグラウンドは，この場合大きな問題にはなりません．	＋	
● X-線フィルムのタイプが異なれば，感度も異なります．最良の結果を得るには，弊社の Lumi-Film，または Kodak XAR，DuPont Cronex 4 を使用してください．		＋
● CSPD や CDP-*Star* の希釈溶液は，1ヶ月以内であれば 1 ～ 2 回再使用することは可能です．使用毎に基質をろ過し，アジ化ナトリウムを加えて 4℃で遮光保存してください．保存する溶液へのコンタミネーションがないように注意します．		
6. プローブの剥離とリプロービング		
第 2 章で薦められている条件よりも高濃度の NaOH や高めのインキュベーション温度を使用しないでください． ***例：***特定のシステムで薦められるプローブ剥離の条件（65℃で 0.4 M NaOH など）が，メンブレンにブロットされているもともとのターゲット DNA まで剥離してしまう場合があります．		＋
剥離用バッファーは常にプラスチックボトルに保存し，ガラス製のボトルを使用しないでください． NaOH がガラスに含まれるケイ酸と反応し塩を生じます．そのため保存後の溶液では NaOH の濃度が低下し，プローブの剥離が効果的に行われない場合があります．	＋＋	＋
プローブ剥離の前に絶対にメンブレンを乾燥させないでください．		＋
プローブ剥離後のメンブレンは，2 × SSC 中で保存します．		＋

付録 D： 各種溶液の調製

1. DNAおよびRNAラベリング用溶液

ラベリングに必要な試薬は，使用するラベリング法に依存します．それぞれのラベリング法で必要になる試薬は，第 2 章の以下の章に全てリストされています．

ラベリング法		試薬がリストされるセクション	ページ
DNAのランダムプライムドラベリング	⇒	第 2 章，セクション 2.1.1	44
DNAのPCRラベリング	⇒	第 2 章，セクション 2.2.1	52
RNAのトランスクリプションによるラベリング	⇒	第 2 章，セクション 2.3.1	63

2. DNA / サザンブロッティングおよびハイブリダイゼーションのための溶液とバッファー

水
サザンブロッティングやハイブリダイゼーション溶液およびバッファー全てに，常にオートクレーブ滅菌された再蒸留水を使用してください．

TEバッファー
10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
pHを8.0（25℃）に調整します．

DNAプローブの希釈バッファー（プローブの収量を概算するため）
50 μg/mlのニシン精子DNAを含むTEバッファー（DIG-High Prime Labeling and Detection Starter Kit I / IIに含まれる）．

DNA用ゲル電気泳動バッファー
89 mM Tris-borate
2 mM EDTA
pHを8.3（25℃）に調整します．

脱プリン化溶液
0.25 M HCl

変性溶液（サザントランスファーまたはコロニー / プラークハイブリダイゼーション用）
0.5 M NaOH
1.5 M NaCl

中和溶液1（サザントランスファー用）
0.5 M Tris-HCl, pH 7.5
1.5 M NaCl

中和溶液 2（コロニー / プラークハイブリダイゼーション用）
1.0 M Tris-HCl, pH 7.4
1.5 M NaCl

DIG Easy Hybハイブリダイゼーションバッファー
オプション1：ready-to-useのDNaseおよびRNaseフリー DIG Easy Hyb溶液の単品試薬(Cat. No. 1 603 558)を使用します．プレハイブリダイゼーションにそのまま使用するか，あるいは適量のラベルされたDNAプローブを加えハイブリダイゼーションに使用します．
オプション2：DNaseおよびRNaseフリーDIG Easy Hyb顆粒の単品試薬(Cat. No. 1 796 895)，あるいはDIG-High Prime Labeling and Detection Starter Kit I/II (Cat. No. 1 745 832 / 1 581 641)の一部を使用します．64 mlの滅菌再蒸留水を(2回に分けて)顆粒試薬の1本に加えます．顆粒が溶解するまで，溶液を37℃で5分間攪拌します．この再懸濁されたDIG Easy Hybを，プレハイブリダイゼーションにそのまま使用するか，あるいは適量のラベルされたDNAプローブを加えハイブリダイゼーションに使用します．

20 × SSC (Cat .No. 1 666 681)
3 M NaCl
0.3 M sodium citrate
pHを7.0(20℃)に調整しオートクレーブします．

SDSストック溶液(Cat. No. 1 028 693, 粉末)
ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate)を10%(w/v)濃度で水に溶解させます．メンブレン(0.2〜0.45 μm)を通してろ過滅菌します．

低ストリンジェンシー洗浄バッファー
2 × SSC (ストックの20 × SSCを 1：10に希釈)，0.1% SDS (ストックの10% SDSを1：100 に希釈)

高ストリンジェンシー洗浄バッファー
0.5 × SSC (ストックの20 × SSCを 1：40に希釈)，0.1%SDS (ストックの10%SDSを1：100 に希釈)

プローブ剥離溶液
(アルカリ感受性dUTPを用いてラベルされたDNAプローブ用)
0.2 M NaOH
0.1% SDS (ストックの10% SDSを 1：100に希釈)

メンブレン洗浄バッファー
(プローブ剥離の後)
2×SSC(ストックの20×SSCを1：10に希釈)

3. RNA / ノーザンブロッティングおよびハイブリダイゼーションのための溶液とバッファー

水
ノーザンブロッティングやハイブリダイゼーション溶液およびバッファー全てに，常にオートクレーブ滅菌済みのDMDC-またはDEPC-処理された再蒸留水を使用してください．DMDC-またはDEPC-処理水はRNaseフリーです．
処理の仕方：50% エタノール/水混合液に1% (例えば，100 mlに対して1 g)のジメチルジカーボネート(DMDC)を溶解します．この1%DMDCストック溶液を再蒸留水に1：10の割合で混合します (最終濃度が0.1% DMDCになります)．室温で30分間インキュベートした後，この処理水をオートクレーブします．
ノート：DEPC(ジエチルピロカーボネート)を使用して水を処理することも可能です．しかし，DEPCよりもDMDCの方が有害性が低いため，弊社ではDMDCをお薦めしています．

RNAプローブの希釈バッファー
(プローブの収量を概算するため)
DMDC-またはDEPC-処理水，20 × SSC，フォルムアルデヒドを，それぞれ5：3：2の割合で混合します．
ノート：水および20 × SSCは，使用前に必ずDMDC-またはDEPC-処理してください(RNaseを不活性化するため)．

10 × MOPSバッファー

200 mM morpholineopropanesulfonic acid（MOPS）
50 mM sodium acetate
20 mM EDTA
NaOHを用いてpHを7.0に調整した後，オートクレーブ滅菌します．
ノート：この溶液はオートクレーブすると黄色く変色しますが，これは溶液の性能に影響しません．1：10に希釈して，RNAゲル泳動バッファーの調製に使用します．

フォルムアミドの脱イオン化

500 mlのフォルムアミドに 50 gのAG501-X8イオン交換樹脂を加えます．この懸濁液をマグネィックスターラー上で30分間ゆっくりと撹拌します．樹脂をろ過して取り除いた後，脱イオンされたフォルムアミドを20℃で保存します．

RNAゲル電気泳動バッファー

使用する直前に，以下の溶液を調製します．

100% 脱イオン化フォルムアミド	250 μl
37%(w/v) フォルムアルデヒド	83 μl
10 × MOPSバッファー	50 μl
2.5% ブロモフェノールブルー	10 μl
100% グリセロール，RNase-フリー	50 μl

DMDC / DEPC処理水で，全体の容量を500 μlに調整します（およそ57 μl必要）．

DIG Easy Hybハイブリダイゼーションバッファー

DNase-およびRNase-フリー DIG Easy Hyb，ready-to-use溶液の単品試薬（Cat. No. 1 603 558），DNase-およびRNase-フリーの DIG Easy Hyb顆粒の単品試薬（Cat.No. 1 796 895），あるいはDIG-High Prime Labeling and Detection Starter Kit I/II（Cat. No. 1 745 832 / 1 581 641）の一部を使用します．
64 mlのDMDC/DEPC処理済み滅菌再蒸留水を（2回に分けて）顆粒試薬の1本に加えます．顆粒が溶解するまで，溶液を37℃で5分間撹拌します．この再懸濁されたDIG Easy Hybを，プレハイブリダイゼーションにそのまま使用するか，あるいは適量のラベルされたRNAプローブを加えハイブリダイゼーションに使用します．

低ストリンジェンシー洗浄バッファー

2 × SSC（ストックの20 × SSCを1：10に希釈），0.1% SDS（ストックの10% SDSを1：100 に希釈）

高ストリンジェンシー洗浄バッファー

0.1 × SSC（ストックの20 × SSCを1：200 に希釈 ; 20 × SSCについては，上記のセクション2を参照），
0.1 % SDS（ストックの10 % SDSを1：100に希釈）

プローブ剥離溶液（RNAプローブ用）

50% フォルムアミド
50 mM Tris-HCl, pH 7.5
5% SDS

メンブレン洗浄バッファー（プローブ剥離の後）

2 × SSC（ストックの20 × SSCを 1：10に希釈）

4. 検出のために必要な溶液とバッファー

ノート：ノーザンブロット上でRNAのハイブリッドを検出する場合，必ず全ての検出試薬をDMDC-またはDEPC-処理水を使用して調製してください(先のセクション3を参照)．RNaseフリーの条件下であることを確認しながら試薬を調製してください．

マレイン酸バッファー
DIG Wash and Block Buffer Set（Cat. No. 1 585 762)の一部である滅菌ヌクレアーゼフリーのストックバッファー(10 × 濃度)を使用します．このストックバッファーを滅菌再蒸留水を用いて1：10に希釈し，マレイン酸バッファーを調製します．

洗浄バッファー
DIG Wash and Block Buffer Set（Cat. No. 1 585 762)の一部である滅菌ヌクレアーゼフリーのストックバッファー(10 × 濃度)を使用します．使用する前にストック溶液をよく振って，バッファー組成を再懸濁させます．このストックバッファーを滅菌再蒸留水を用いて 1：10 に希釈し，洗浄用バッファーを調製します．

ブロッキング溶液
DIG Wash and Block Buffer Set（Cat. No. 1 585 762)，DIG-High Prime Labeling and Detection Starter Kit II（Cat. No. 1 585 641)，または DIG Northern Starter Kit（Cat. No. 2 039 672)の一部である滅菌ヌクレアーゼフリーのストック溶液(10 × 濃度)を使用します．マレイン酸バッファーは，滅菌再蒸留水を用いて1：10に希釈して使用します．使用する直前にこのストック溶液を1×濃度のマレイン酸バッファーを用いて1：10に希釈し，ブロッキング溶液(1%)を調製します．

検出バッファー
DIG Wash and Block Buffer Set（Cat. No. 1 585 762)の一部である滅菌ヌクレアーゼフリーのストックバッファー(10 × 濃度)を使用します．このストックバッファーを滅菌再蒸留水を用いて1：10に希釈し，検出バッファーを調製します．

化学発光基質溶液
オプション 1：CDP-*Star,* ready-to-useの単品試薬(Cat. No. 2 041 677)またはDIG Northern Starter Kit（Cat. No. 2 039 672)の一部をそのまま使用します．
オプション 2：CSPD, ready-to-use の単品試薬(Cat. No. 1 755 633)またはDIG-High Prime Labeling and Detection Starter Kit II (Cat. No. 1 585 641)の一部をそのまま使用します．

発色基質溶液
オプション 1：NBT / BCIPストック溶液の単品試薬(Cat. No. 1 681 451)またはDIG-High Prime Labeling and Detection Starter Kit I（Cat. No. 1 745 832)の一部を使用します．使用する直前に，200 μ1のストック溶液を10 mlの検出バッファーに加え，発色基質溶液を調製します．
オプション 2：NBT/BCIPタブレットの単品試薬(Cat. No. 1 697 471)を使用します．使用する直前に，10 mlの滅菌再蒸留水に1タブレットを加え，発色基質溶液を調製します．

アルカリホスファターゼ不活性化用バッファー
50 mM EDTA
pHを8.0(20℃)に調整します．

5. その他の溶液とバッファー

N-lauroylsarcosineストック溶液

N-lauroylsarcosineを10%(w/v)濃度で水に溶解させます.
メンブレン(0.2〜0.45 μm)を通してろ過滅菌します.

高SDSハイブリダイゼーションバッファー

7% SDS
50% 脱イオン化フォルムアミド
5 × SSC
0.1% N-lauroylsarcosine
2% ブロッキング溶液 (10%ストック溶液を1：5に希釈したもの. 先のセクション 4 を参照)
50 mM sodium phosphate, pH 7.0

500 mlの高SDSハイブリダイゼーションバッファーを調製するには, 以下のストック溶液を順番に混合します.

100% 脱イオン化フォルムアミド	250 ml
30 × SSC	83 ml
1 M sodium phosphate, pH 7.0	25 ml
10% ブロッキング試薬	100 ml
10% N-lauroylsarcosine	5 ml

上記混合液を, 35gのSDSを入れた三角フラスコ(Erlenmeyer flask)に加えます(SDSを気管に吸引しないよう注意すること). SDSが溶解するまで, 溶液を加熱しながら撹拌します. 滅菌再蒸留水を用い, 溶液の最終容量を500 mlに調整します. 溶液を室温で保存しますが, 使用前に65℃に加熱してから使用します.

標準的なハイブリダイゼーションバッファー

5 × SSC
0.1% N-lauroylsarcosine
0.02% SDS
1%ブロッキング溶液(10%ストック溶液を1：10に希釈したもの.)

50%フォルムアミドを含む標準的なハイブリダイゼーションバッファー

5 × SSC
50% 脱イオン化フォルムアミド
0.1% N-lauroylsarcosine
0.02% SDS
2%ブロッキング溶液(10%ストック溶液を1：5に希釈したもの.)

付録 E： ご注文情報とDIGシステムの製品一覧

ラベリング用キット	Cat. No.	包装サイズ
DIG DNA Labeling Kit [1]	● 1 175 033	● 1 キット（40ラベリング反応）
DIG-High Prime [2]	● 1 585 606	● 160 µl（40ラベリング反応）
DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd generation [1]	● 3 353 575	● 1 キット（25ラベリング反応）
DIG Oligonucleotide 5'-End Labeling Set	● 1 480 863	● 1 セット（10ラベリング反応）
DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd generation [3]	● 3 353 583	● 1 キット（25テーリング反応）
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) [1]	● 1 175 025	● 1 キット（2 × 10ラベリング反応）
PCR DIG Probe Synthesis Kit [4]	● 1 636 090	● 1 キット（25ラベリング反応）

ラベリングおよび検出用キット	Cat. No.	包装サイズ
DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I [5]（NBT/BCIP による発色検出）	● 1 745 832	● 1 キット（12ラベリング反応と24検出反応）
DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II [5]（CSPD,ready-to-use による化学発光検出）	● 1 585 614	● 1 キット（12ラベリング反応と24検出反応）
DIG Northern Starter Kit	● 2 039 672	● 1 キット（10 × 10cm²メンブレンに対し、10ラベリング反応および検出反応）
DIG DNA Labeling and Detection Kit [6]	● 1 093 657	● 1 キット（25ラベリング反応と50検出反応）

検出用キット	Cat. No.	包装サイズ
DIG Luminescent Detection Kit [6]	● 1 363 514	● 1 キット（50ブロット用）
Biotin Luminescent Detection Kit	● 1 811 592	● 1 キット（50ブロット用）
DIG Nucleic Acid Detection Kit [5]	● 1 175 041	● 1 キット（40ブロット用）

メンブレン上の核酸検出用抗DIG標識抗体	Cat. No.	包装サイズ
Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments [5]	● 1 093 274	● 150 U（200 µl）
Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments [5]	● 1 207 733	● 150 U
Anti-Digoxigenin-POD (poly), Fab fragments [5]	● 1 633 716	● 50 U

アルカリホスファターゼの基質	Cat. No.	包装サイズ
BM purple	● 1 442 074	● 100 ml
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)	● 1 383 221	● 3 ml（150 mg）
HNPP Fluorescent Detection Set	● 1 758 888	● 1 セット（5 mg HNPP, 100 mg Fast Red TR）
4-Nitroblue tetrazolium chloride (NBT)	● 1 383 213	● 3 ml（300 mg）
NBT/BCIP Ready-to-Use Tablets	● 1 697 471	● 20タブレット
NBT/BCIP Stock Solution	● 1 681 451	● 8 ml
CDP-*Star* [7]	● 1 685 627 ● 1 759 051	● 1 ml ● 2 × 1 ml
CDP-*Star*, ready-to-use [7]	● 2 041 677	● 2 × 50 ml
CSPD [8]	● 1 655 884 ● 1 759 035 ● 1 759 043	● 1 ml ● 2 × 1 ml ● 4 × 1 ml
CSPD, ready-to-use [8]	● 1 755 633	● 2 × 50 ml

DIGラベルされた分子量マーカー	Cat. No.	包装サイズ
DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled [5]	● 1 218 590	● 5 µg (500 µl)
DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled [5]	● 1 218 603	● 5 µg (500 µl)
DNA Molecular Weight Marker V, DIG-labeled [5]	● 1 669 931	● 5 µg (500 µl)
DNA Molecular Weight Marker VI, DIG-labeled [5]	● 1 218 611	● 5 µg (500 µl)
DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled [5]	● 1 669 940	● 5 µg (500 µl)
DNA Molecular Weight Marker VIII, DIG-labeled [5]	● 1 449 451	● 5 µg (500 µl)
RNA Molecular Weight Marker I, DIG-labeled [5]	● 1 526 529	● 4 µg (200 µl)
RNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled [5]	● 1 526 537	● 2 µg (200 µl)
RNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled [5]	● 1 373 099	● 2 µg (200 µl)

DIGラベルされた核酸およびプローブ	Cat. No.	包装サイズ
Actin RNA Probe, DIG-labeled	● 1 498 045	● 2 µg
DIG-labeled Control DNA [6]	● 1 585 738	● 50 µl
DIG-labeled Control RNA [6]	● 1 585 746	● 50 µl

Non-RI 核酸ラベリングミックス	Cat. No.	包装サイズ
Biotin High Prime [5]	● 1 585 649	● 100 µl (25反応)
Biotin RNA Labeling Mix	● 1 685 597	● 40 µl (20反応)
DIG DNA Labeling Mix [5]	● 1 277 065	● 50 µl (25反応)
DIG High Prime [2]	● 1 585 606	● 160 µl (40反応)
DIG RNA Labeling Mix [5]	● 1 277 073	● 40 µl (20反応)
Fluorescein High Prime [5]	● 1 585 622	● 100 µl (25反応)
PCR Fluorescein Labeling Mix	● 1 636 154	● 100 µl (10反応)
Fluorescein RNA Labeling Mix	● 1 685 619	● 40 µl (20反応)
PCR DIG Labeling Mix PLUS [5]	● 1 835 289	● 2 × 250 µl (2 × 50反応)
Nick Translation Mix	● 1 745 808	● 200 µl
DIG-Nick Translation Mix	● 1 745 816	● 160 µl
Biotin-Nick Translation Mix	● 1 745 824	● 160 µl

Non-RI ラベリング用ヌクレオチド	Cat. No.	包装サイズ
Biotin-16-ddUTP	● 1 427 598	● 25 nmol (25 µl)
Biotin-16-dUTP	● 1 093 070	● 50 nmol (50 µl)
Biotin-16-UTP	● 1 388 908	● 250 nmol (25 µl)
Digoxigenin-11-ddUTP [5]	● 1 363 905	● 25 nmol (25 µl)
Digoxigenin-11-dUTP, alkali-labile [5]	● 1 573 152 ● 1 573 179	● 25 nmol (25 µl) ● 125 nmol (125 µl)
Digoxigenin-11-dUTP, alkali-stable [9]	● 1 093 088 ● 1 558 706 ● 1 570 013	● 25 nmol (25 µl) ● 125 nmol (125 µl) ● 5 × 125 nmol (5 × 125 µl)
Digoxigeinin-11-UTP [10]	● 1 209 256	● 250 nmol (25 µl)
Fluorescein-12-dUTP	● 1 373 242	● 25 nmol (25 µl)
Fluorescein-12-UTP	● 1 427 857	● 250 nmol (25 µl)
Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP	● 1 534 378	● 25 nmol (25 µl)

ノンラジオアクティブな核酸の解析に追加で必要とされる試薬	Cat. No.	包装サイズ
Blocking Reagent	● 1 096 176	● 50 g
DIG Easy Hyb	● 1 603 558	● 500 ml
DIG Easy Hyb Granules	● 1 796 895	● 6 × 100ml用 顆粒
DIG Control Teststrips	● 1 669 966	● 25テストストリップ
DIG Quantification Teststrips	● 1 669 958	● 50テストストリップ
DIG Wash and Block Buffer Set	● 1 585 762	● 1セット（30ブロット用）
Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimid eester[9]（DIG-NHS-エステル）	● 1 333 054	● 5 mg
Hexanucleotide Mix	● 1 277 081	● 100 µl（50反応）
Hybridization Bags	● 1 666 649	● 50バッグ（25 × 24 cm）
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	● 1 666 916 ● 1 666 657	● 100フィルム（18 × 24 cm） ● 100フィルム（20.3 × 25.4 cm）
Nylon Membranes, positively charged	● 1 209 272 ● 1 209 299 ● 1 417 240	● 10枚（20 × 30 cm） ● 20枚（10 × 15 cm） ● 1ロール（0.3 × 3 m）
Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization	● 1 699 075 ● 1 699 083	● 50ディスク（直径82 mm） ● 50ディスク（直径132 mm）

アガロース	Cat. No.	包装サイズ
Agarose LE （低電気浸透）	● 1 685 660 ● 1 685 678	● 100 g ● 500 g
Agarose LM-MP （低融点の多目的アガロース）	● 1 441 345 ● 1 441 353	● 50 g ● 100 g
Agarose MP （多目的アガロース）	● 1 388 983 ● 1 388 991	● 100 g ● 500 g
Agarose MS （分子スクリーニング用アガロース）	● 1 816 586 ● 1 816 594	● 100 g ● 500 g

核酸の精製	Cat. No.	包装サイズ
Agarose Gel DNA Extraction Kit	● 1 696 505	● 100反応
DNA Isolation Kit for Cells and Tissue **	● 1 814 770	● 400 mg 組織または5×10^7 細胞に対して10分離反応
DNA Isolation Kit for Mammalian Blood **	● 1 667 327	● 25精製反応
High Pure PCR Product Purification Kit **	● 1 732 668 ● 1 732 676	● 50精製反応 ● 250精製反応
High Pure PCR Template Purification Kit **	● 1 796 828	● 100精製反応
High Pure Plasmid Isolation Kit	● 1 754 777 ● 1 754 785	● 50精製反応 ● 250精製反応
High Pure Viral Nucleic Acid Kit **	● 1 858 874	● 100精製反応
PCR Clean Up Kit **	● 1 696 513	● 100精製反応まで
Mini Quick Spin DNA Columns	● 1 814 419	● 50カラム
Mini Quick Spin RNA Columns	● 1 814 427	● 50カラム
High Pure RNA Isolation Kit **	● 1 828 665	● 50精製反応
High Pure Viral RNA Kit **	● 1 858 882	● 100精製反応
mRNA Isolation Kit	● 1 741 985	● ＞ 70 µ g mRNA
mRNA Capture Kit **	● 1 787 896	● 192反応

パテント

1) Roche Diagnostics GmbHが所有するEP Patent No. 0324474により保護されています.
Institute Pasteurにより認可されています.

2) Roche Diagnostics GmbHが所有するEP Patent No. 0324474およびEP Patent申請 0371262により保護されています. この製品またはこの製品の使用は, Roche Diagnostics GmbHの一つまたはそれ以上のパテントにより保護される場合があります. 以下のパテントがこれに含まれます：EP Patent 申請No.0649909 (ペンディング).
Institute Pasteurにより認可されています.

3) Roche Diagnostics GmbHが所有するEP Patent No. 0124657および0324474により保護されています. Institute Pasteurにより認可されています.

4) Roche Diagnostics GmbHが所有するEP Patent No. 0324474により保護されています.

5) Roche Diagnostics GmbHが所有するEP Patent No. 0124657およびU.S. Patent No. 5,344,757により保護されています.

6) Roche Diagnostics GmbHが所有するEP Patent No. 0324474, EP Patent申請0371262およびU.S. Patent No. 5,344,757により保護されています.
Institute Pasteurにより認可されています.
7) Tropix Inc. USAへ譲渡されたU.S. Patent No. 5,326,882により保護されています.

8) EP申請0497972およびU.S. Patent No. 5,112,960により保護されています.
両ライセンスともTropix Inc. USAへ譲渡されています.

9) Roche Diagnostics GmbHが所有するEP Patent申請 0371262により保護されています.

10) Roche Diagnostics GmbHが所有するEP Patent No. 0324474, EP Patent申請0371262およびU.S. Patent No. 5,344,757により保護されています.
* この製品はRoche Molecular SystemsとThe Perkin-Elmer Corporationとのライセンス契約の下に販売されています. この製品の購入には, 公認のサーマルサイクラーの使用と組み合わせたポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)への使用のためのライセンスが付随します.
ライセンス放棄証明書については, 206ページの放棄証明書 2 を参照ください.
** この製品はRoche Molecular SystemsとThe Perkin-Elmer Corporationとのライセンス契約の下に販売されています. ライセンス放棄証明書については, 206ページの放棄証明書 1 を参照ください.

索　引

索 引

A

About this manual	このマニュアルについて	6
Additives to DIG System buffers	DIGシステム用バッファーへの添加剤	26
Advantage of		
Alkaline phosphatase substrates	アルカリホスファターゼ基質の利点	29
DIG labeling methds	DIGラベリング法の利点	11
Agarose		
Gel	アガロースゲル	19
Gel DNA Extraction Kit	Gel DNA Extraction Kit	46, 174
MP	MP	35
Air bubble	気泡	130, 169, 179
Alkali-labile probes, stripping	アルカリ感受性プローブの剥離	31, 122
Alkaline phosphatase, inactivation of	アルカリホスファターゼの不活性化	121, 186
Alkaline phosphatase substrates		
Chemiluminescent	アルカリホスファターゼの化学発光基質	29, 107
Chromogenic	アルカリホスファターゼの発色基質	30, 115
Overview	アルカリホスファターゼ基質の概要	29
Sensitivity	アルカリホスファターゼ基質の感度	161
Amount of target nucleic acid		
required	ターゲットとして必要な核酸の量	19
Analysis of PCR labeling	PCRラベリングの解析	57
Anti-DIG	抗DIG抗体	4
Tips on	抗DIG抗体に関するヒント	181
Working dilution of,		
chemiluminescent detection	抗DIG抗体、化学発光検出での希釈率	108
chromogenic detection	抗DIG抗体、発色検出での希釈率	117
Antisense RNA	アンチセンスRNA	62
Application for DIG labeling	DIGラベリングのアプリケーション	40, 138

B

Background		
Irregular, cloudy	不規則で雲様のバックグラウンド	163
Irregular, smeared, grainy	不規則でスメア、粒状のバックグラウンド	164
Nonspecific	非特異的なバックグラウンド	168
On one part of membrane	メンブレンの一部分にバックグラウンド	164
Spotty	スポット状のバックグラウンド	165
Uniform high	全体的に高いバックグラウンド	163
Baking DNA on membrane	メンブレン上のDNAのベーキング	88, 177
BCIP	BCIP	115
Blocking reagent	ブロッキング試薬	4
Blocking solution	ブロッキング溶液	186
Blot	ブロット	21, 84, 175
Membranes, different types of	ブロッティングメンブレンの様々なタイプ	22
Storage of	ブロットの保存	89, 99
Blot transfer		
Advantages of	ブロットトランスファーの利点	21
Blot transfer		
Amount of salt to use	ブロットトランスファーに使用する塩の量	21
Buffers for	ブロットトランスファーバッファー	183, 184
Choosing a method	ブロットトランスファー法の選択	21

Critical hints about	ブロットトランスファーの重要なヒント	103
Diagram of setup	ブロットトランスファーのセットアップの図	88
Methods	ブロットトランスファー法	21
Weight to use	ブロットトランスファーに使用する重り	88
Buffers for		
Blot transfer	ブロットトランスファーバッファー	183, 184
Hybridization	ハイブリダイゼーションバッファー	183, 184

C

Calculation of hybridization temperature	ハイブリダイゼーション温度の計算	159
Capillary transfer	キャピラリートランスファー	21, 87, 177
CDP-*Star*	CDP-*Star*	29
Cell debris	細胞のデブリス	131
Cellulose acetate filtration	セルロースアセテートフィルターろ過	171
Cesium chloride	塩化セシウム	174
Characteristics of blot membranes	ブロッティングメンブレンの特徴	22
Checking PCR labeling	PCRラベリングの確認	57
Chemiluminescent		
Alkaline phosphatase substrate	化学発光アルカリホスファターゼ基質	29
Detection, results	化学発光検出の結果	113
Detection, technique	化学発光検出のテクニック	106
Detection, troubleshooting	化学発光検出のトラブルシューティング	110
Peroxidase substrate	化学発光ペルオキシダーゼ基質	139
Western blot substrate	化学発光ウェスタンブロッティングの基質	139
Choosing a blot transfer method	ブロットトランスファー法の選択	21
Chromogenic		
Alkaline phosphatase substrate	発色アルカリホスファターゼ基質	30
Detection, results	発色検出の結果	121
Detection, tequnique	発色検出のテクニック	115
Chromosomal DNA, interference of	染色体DNAの干渉	46
Cleaning "dirty" probes	不純物を含むプローブをきれいにする	50
Colony hybridization	コロニーハイブリダイゼーション	126
Typical results with	コロニーハイブリダイゼーションの代表的な結果	135
Color substrate	発色基質	115
Comments on DIG labeling methods	DIGラベリング法に対する解説	11
Comparison of		
DNA and RNA probes	DNAプローブとRNAプローブの比較	13
mRNA and total RNA probes	mRNAプローブとトータルRNAプローブの比較	74
PCR DIG Labeling Mix and PCR DIG Probe Synthesis Kit	PCR DIG Labeling Mixと PCR DIG Probe Synthesis Kitの比較	153
Popular labeling methods	汎用される種々のラベリング法の比較	11
Concentration of template	テンプレート濃度	53, 58, 59
Controls, DIG-labeled	DIGラベルされたコントロール	75
CSPD	CSPD	29
Cycler settings for		
PCR labeling	PCRラベリング用のサイクラーの設定	56
Production of RNA labeling template	RNAラベリングテンプレートの生成用のサイクラーの設定	68

D

Deletions, detecting	欠失の検出	146
Denaturation of template	テンプレートの変性	47, 56
Denaturation solution for gels	ゲルの変性溶液	183
Density gradient	密度勾配	46
DEPC	DEPC	184
Depurination	脱プリン	176, 183
Detection buffer	検出バッファー	186
Detection		
Of alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼの検出	29
Of bacterial colonies on a plate	Lumi-Imagerを用いた	
Of deletions	欠失の検出	146
Of digoxigenin	ジゴキシゲニンの検出	29, 106
Of DNA-protein complexes	DNA-タンパク複合体の検出	149
Detection of probe-target		
hybrids	プローブとターゲットとのハイブリッド	29
Chemiluminescent methods	化学発光法によるプローブとターゲットとのハイブリッド	106
Chomogenic methods	発色法によるプローブとターゲットとのハイブリッド	115
Differential mobility of		
DNA-protein complexes	DNA-タンパク複合体の移動度の違い	149
DIG basics	DIGの基礎	156
Summary of	DIGの基礎のまとめ	156〜161
DIG-dUTP to dTTP ratio,		
effects of	DIG-dUTPとdTTPとの比率とその効果	14, 59
DIG-Easy Hyb	DIG-Easy Hyb	26, 104, 158
Amount required for hybridization	ハイブリダイゼーションで必要とされる量	89, 100
DIG Gel Shift Kit	DIG Gel Shift Kit	149
DIG-High Prime Kit	DIG-High Prime Kit	44
DIG-labeled DNA probe,		
storage of	DIGラベルプローブの保存	48, 58, 69
DIG-labeled probe,		
concentration of	DIGラベルプローブの濃度	
DIG labeling, see Labeling	DIGラベリング, ラベリングを参照	158
DIG laboratory,equipping	DIG操作のための実験室の設備	33
DIG Northern Starter Kit	DIG Northern Starter Kit	63
DIG Oligonucleotide Labeling Kits	DIG Oligonucleotide Labeling Kit	74
Digoxigenin	ジゴキシゲニン	3
DIG Product Selection Guide	DIG製品セレクションガイド	36
DIG System,		
General precautions	DIGシステムにおける一般的な注意	174
Improving results	DIGシステムでの結果を改善する	174
Overview	DIGシステムの概要	11
Products ordering information for (Appendix E)	DIGシステム製品のご注文情報（付録 E）	188
Troubleshooting	DIGシステムのトラブルシューティング	162
DIG Tailing Kit	DIG Tailing Kit	74
DIG Wash and Block Buffer Set	DIG Wash and Block Buffer Set	186
Dilution of probe	プローブの希釈	76
Dimethylformamide	ジメチルフォルムアミド	122
"Direct detection assay,		
Overview of	直接検出アッセイの概要	16
Evaluation of	直接検出アッセイの評価	16
Procedure	直接検出アッセイの操作方法	76

Results	直接検出アッセイの結果	17
Serial dilutions for	直接検出アッセイに使用する希釈系列	78, 79, 80
When to use	直接検出アッセイの用途	16
Direct detection of DIG-labeled DNA on a gel	DIGラベルDNAをゲル上で直接検出する	18, 151
Direct labeling with DIG	DIGを用いた直接ラベリング	74
"Dirty" probes, cleaning	不純物を含むプローブをきれいにする	50
DMDC	DMDC	65, 184
DNA molecular weight marker	DNA分子量マーカー	38
DNA-protein complexes	DNA-タンパク複合体	149
DNase I	DNase I	69
Dry membrane, effects of	メンブレンの乾燥による影響	167, 178

E

Effect of DIG labeling on mobility	DIGラベリングが移動度に与える影響	18, 57
Electrophoresis of target nucleic acids	ターゲット核酸の電気泳動	19
Critical hints about	重要な情報	103
Electrostatic charge	静電的な電荷	167
EMSA	EMSA	149
End Labeling Kit	末端ラベリングキット	74
Equipping a DIG laboratory	DIG操作のための実験室の設備	33
Estimation of PCR labeling	PCRラベリングの概算	18, 57
Estimation of probe labeling	プローブラベリングの概算	16, 75
Ethidium bromide staining technique	臭化エチジウムの染色テクニック	19
Ethidium bromide, sensitivity of	臭化エチジウムの感度	19
Exon-intron structure of genes	遺伝子のエクソン-イントロン構造	146
Expand High Fidelity Enzyme Blend	Expand High Fidelity酵素ブレンド	67
Expand Long Template Enzyme Blend	Expand Long Template酵素ブレンド	67
Evaluation of probe labeling	プローブラベリングの評価	57, 75

F

Filtration	ろ過	163
Chemiluminescent detection of probes on a blot	ブロット上のプローブの化学発光検出	107
Chromogenic detection of probes on a blot	ブロット上のプローブの発色検出	117
Colony hybridization	コロニーハイブリダイゼーション	129
Estimation of probe yield	プローブの収量の概算	76
Hybridization of DNA probes to a Southern blot	サザンブロットへのDNAプローブのハイブリダイゼーション	86
Hybridization of RNA probes to a Northern blot	ノーザンブロットへのRNAプローブのハイブリダイゼーション	96
Flow chart for	フローチャート	
Labeling of RNA probes	RNAプローブのラベリング	65
PCR labeling or probes	PCRラベリングまたはプローブ	53
Performing a DIG labeling and detection experiment	DIGラベリングおよび検出実験を行う	7
Plaque hybridization	プラークハイブリダイゼーション	129
Random primed labeling	ランダムプライムドラベリング	45
Forceps	ピンセット	167
Formamide	フォルムアミド	24, 185
Effect on hybridization"	ハイブリダイゼーションに対する作用	24
Formaldehyde	フォルムアルデヒド	20
Four-base cutter	4塩基認識の制限酵素	46
Fragile X	Fragile X	61

G

GC content, effect of	GC含有率の影響	25
Gel electrophoresis of labeled probes	ラベルされたプローブのゲル電気泳動	18, 57
Gel mobility shift assay	ゲルシフトアッセイ	149
Gene rearrangement, detecting	遺伝子の転位(rearrangement)の検出	146
Genomic libraries	ジェノミックライブラリー	125
Glyoxal	グリオキサル	176

H

High background	バックグラウンドが高い	163, 164
High Pure PCR Purification Kit	High Pure PCR Purification Kit	46
High Pure Plasmid Isolation Kit	High Pure Plasmid Isolation Kit	46
High stringency wash	高ストリンジェンシー洗浄	28
High volume screening techniques	大容量スクリーニングのテクニック	125
HNPP	HNPP	5
Hybridization bag	ハイブリダイゼーションバッグ	89, 100
Wrinkles in	バッグにしわが入ると…	164
Hybridization		
Buffers	ハイブリダイゼーションバッファー	25
Probe, *see Probe, hybridization*	*プローブ, プローブ, ハイブリダイゼーションを参照*	
Sequence, influence of	シークェンスの作用	25
Hybridization solution	ハイブリダイゼーション溶液	25
Amount to use	使用量	89, 100
Insufficient	溶液が不充分だと…	165
Hybridization techniques	ハイブリダイゼーションのテクニック	
Amount of DNA probe required	DNAプローブの必要量	75〜84
Amount of RNA probe required	RNAプローブの必要量	75〜84
Critical hints about	テクニックに関する重要なヒント	103, 104
For colony/plaque lifts	コロニー/プラークリフトの検出	126
For DNA probes and DNA targets	DNAプローブを用いたDNAターゲットの検出	84
For DNA probes and RNA targets	DNAプローブを用いたRNAターゲットの検出	102
For oligonucleotide probes and DNA targets	オリゴヌクレオチドプローブを用いたDNAターゲットの検出	93
For RNA probes and RNA targets	RNAプローブを用いたRNAターゲットの検出	94
Importance of sealed containers	密閉容器の重要性	178
Mock	モック	172
Overview	概要	23
Temperature required	必要とされる温度	24
Hybridization techniques	ハイブリダイゼーションのテクニック	
Time required	所要時間	27
Transparancy techniqu	トランスパランシーテクニック	133
Troubleshooting	トラブルシューティング	105
Use of plastic wrap	プラスチック製ラップを使用すると…	89, 100
Hybridization temperature, Optimal	ハイブリダイゼーション温度, 最適温度	159

I

Insertions, detecting	挿入(insertion)の検出	146
In situ hybridization	*in situ* ハイブリダイゼーション	4
Internal control RNA	インターナルコントロールRNA	146
Intron-exon structure of genes	遺伝子のイントロン-エクソン構造	146
In vitro transcription	*in vitro*トランスクリプション	14

K

Klenow	クレノー酵素	14

L

Labeled probe, yield of,	ラベルされたプローブの収量,	
see Yield or labeled probe	*収量またはラベルされたプローブを参照*	
Labeling	ラベリング	
By PCR	PCRによる	51
By randam primed method	ランダムプライムド法による	43
Direct	直接法による	74
Methods	ラベリング法	11
Of oligonucleotide	オリゴヌクレオチドを対象	73
Of RNA by transcription	トランスクリプションによるRNAを対象	62
Overview	ラベリングの概要	11
Sensitivity of	ラベリングとプローブの感度	11
Template requirements	ラベリングに必要なテンプレート	11
Laboratory equipment for DIG	DIG操作のための実験室の設備	
labeling and detection	ラベリングおよび検出	33
Lifts, colony/plaque	コロニー/プラークリフト	126
List of procedures	操作方法のリスト	7
Low labeling efficiency	ラベリング効率が低い	50, 59, 71
Low stringency wash	低ストリンジェンシー洗浄	28
Lumi-Film	Lumi-Film	107
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Lumi-Light Western Blotting Substrate	139
Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Kit	Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Kit	139
Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Substrate	Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Substrate	139

M

Maleic Acid Buffer	マレイン酸バッファー	186
Magnesium ions	マグネシウムイオン	165
Mapping transcriptional start sites	転写開始部位のマッピング	146
Mapping transcriptional termination sites	転写終止部位のマッピング	146
Maxi-preps	マキシ-プレップ	46
Membrane		
Diffuse bands on	メンブレン上でバンドが拡散した	168
Letting dry out	メンブレンを乾燥させた	163
Missing bands on	メンブレン上のバンドが失われた	169
Problems with background,	メンブレンのバックグラウンドに関する問題,	
see Background	*バックグラウンドを参照*	
Reprobing	メンブレンのリプロービング	31, 122
Salt crystals on	メンブレン上に塩結晶が析出した	166
Stripping	メンブレンからのプローブの剥離	31, 122
Unsuitable	メンブレンの不適切なタイプ	166
Methods for DIG labeling	DIGラベリングの方法	11
Mini-preps	ミニ-プレップ	46
Mock hybridization	モックハイブリダイゼーション	172
Molecular weight marker	分子量マーカー	38
MOPS	MOPS	20, 185
mRNA, detection of rare	発現量の少ないmRNAの検出	113
mRNA Isolation Kit	mRNA Isolation Kit	75

N

NBT/BCIP	NBT/BCIP	5, 115
Neutralization of gels	ゲルの中和	87, 183
NGF mRNA	NGF由来mRNA	113
Nick Translation	ニックトランスレーション	4
Nonradioactive	ノンラジオアクティブ法による	
Detection of PCR production ona gel	PCR産物のゲル上での検出	18, 57

Gel mobility shift assay	ゲルシフトアッセイ	149
RNase protection assay	RNaseプロテクションアッセイ	146
Telomerase length assay	テロメラーゼレングスアッセイ	142
Western blot assay	ウェスタンブロットアッセイ	139
Northern blot	ノーザンブロット	94
Kits for	ノーザンブロットのためのキット	63
N-RAS	N-RAS	121
Nucleic acids,	核酸,	
see Target nucleic acids	*ターゲット核酸を参照*	
Nylon membrane for colony/ plaque hybridization	コロニー/プラークハイブリダイゼーション用 ナイロンメンブレン	126
Nylon membrane, positively charged	ナイロンメンブレンポジティブチャージ	22

O

Oct2A	Oct2A	151
Oligonucleotide	オリゴヌクレオチド	
Calculation of amount	量の計算	74
Labeling	ラベリング	73
Probes, Sensitivity of	プローブの感度	74
Optimal hybridization temperature	ハイブリダイゼーションの最適温度	158
Optimizing PCR	PCRの最適化	58
Overview of DIG labeling methods	DIGラベリング法の概要	11

P

PCR DIG Labeling Mix	PCR DIG Labeling Mix	151
Comparison with PCR DIG Probe Synthesis Kit	PCR DIG Probe Synthesis Kitとの比較	153
Sensitivity of	PCR DIG Labeling Mixの感度	153
PCR DIG Probe Synthesis Kit	PCR DIG Probe Synthesis Kit	52
Comparison with PCR DIG Labeling Mix	PCR DIG Labeling Mixとの比較	153
PCR labeling	PCRラベリング	202
Critical hints about	重要なヒント	58
Troubleshooting for	トラブルシューティング	59
Typical result with	代表的な結果	61
PFGE	PFGE	20
Plaque hybridization	プラークハイブリダイゼーション	126
Plasmid purification	プラスミドの精製	46
Plastic	プラスチック	
Film	フィルム	133
Tranparancy	トランスパランシー	133
Wrap, problems with	ラップの使用による問題	164
Polylinker	ポリリンカー	175
Popular DIG labeling methods	汎用されるDIGラベリング法	13
Prehybridization	プレハイブリダイゼーション	178
Pretreatment of gel before blot transfer	ブロットトランスファーの前にゲルを処理する	176
Prewarming wash buffers	洗浄用バッファーを予め温める	181
Probe, hybridization	プローブのハイブリダイゼーション	
Concentration during hybridization	ハイブリダイゼーション中でのプローブ濃度	23
Denaturation of	変性	104
Effects of too little	少なすぎる場合の影響	172
Effects of too much	多すぎる場合の影響	163
Filtration of	フィルターろ過	178
Homology with target	ターゲットとのホモロジー	159
Labeling, estimation of	ラベリングの概算	75

Labeling, yield of,	ラベリングの収量,	
see Yield of labeled probe	*ラベルされたプローブの収量を参照*	
Uneven distribution of	不均一に拡散した	165
Problems with background,	バックグラウンドによる問題,	
see Background	*バックグラウンドを参照*	
Procedures, list of	操作方法のリスト	7
Proteinase K	プロティナーゼK	175
Pulse field gel electrophoresis	パルスフィールドゲル電気泳動	20
Purification of template	テンプレートの精製	
For PCR labeling	PCRラベリング用テンプレート	54
For randam primed labeling	ランダムプライムドラベリング用テンプレート	45
For RNA transcriptional labeling	トランスクリプションによるRNAラベリング用テンプレート	66

Q

Quantification	定量	
Of labeled probe	ラベルされたプローブ	75

R

Rainbow detection	レインボー検出	121
Random primed labeling technique	ランダムプライムドラベリングのテクニック	43
Critical hints about	重要なヒント	49
Troubleshooting for	トラブルシューティング	50
Typical results with	代表的な結果	173
Rapid DNA Ligation Kit	Rapid DNA Ligation Kit	66
Reagents for DIG System (Appendix E)	DIGシステムに使用する試薬(付録E)	188
Reprobing membrane	メンブレンのリプロービング	31, 122
Reverse transcriptase	逆転写酵素(リバーストランスクリプターゼ)	64, 67
Roller bottle	ローラーボトル	163, 179
RNA, alkali treatment of	RNAのアルカリ処理	98
RNA electrophoresis	RNAの電気泳動	20, 97
RNA labeling	RNAラベリング	62
Critical hints about	重要なヒント	70
Troubleshooting for	トラブルシューティング	71
Typical results with	代表的な結果	72
RNA loading buffer	RNAローディングバッファー	95, 185
RNA polymerases	RNAポリメラーゼ	62
Promoter sequences for	プロモーターシークェンス	62
RNA, separating on gels	RNAのゲル分離	20, 97
RNase		
contamination, preventing	RNaseのコンタミネーションを防ぐ	70, 180
Protection assay	RNaseプロテクションアッセイ	146
Protection Kit	RNase Protection Kit	146
T1	RNase T1	146
rRNA signals on blot, unwanted	rRNAによる不要なシグナルがブロット上に現れた	169

S

Salt crystals on membrane	塩結晶がメンブレン上に析出した	166
Salt for blot transfer, amount to use	ブロットトランスファーに使用する塩の量	21
"Sandwich", blot transfer	「サンドイッチ」ブロットトランスファー	88, 98
Screening colonies and plaques	コロニーおよびプラークのスクリーニング	126
Sensitivity	感度	
Of DIG labeling	DIGラベリング	11
Of DNA and RNA probes, comparison	DNAプローブとRNAプローブとの比較	15
Of oligonucleotide probes	オリゴヌクレオチドプローブ	12

Separation of DNA on a gel	DNAのゲル分離	19, 87
Separation of RNA on a gel	RNAのゲル分離	20, 97
Serial dilutions	希釈系列	122
Single gene detection, optimization of	シングルコピー遺伝子検出の最適化	171
Southern blot	サザンブロット	84
Diagram of setup	セットアップの図	88
Spotting probe on membrane	プローブをメンブレン上で検出する	16, 75
Stability of DIG-labeled DNA probe	DIGラベルDNAプローブの安定性	2
Stop buffer	ストップバッファー(反応停止用バッファー)	65
Storage	保存方法	
Of DNA probe	DNAプローブ	48, 58
Of membrane	メンブレン	93, 99
Of RNA probe	RNAプローブ	69, 70
Stripping buffer	プローブ剥離バッファー	122
Stripping of membrane	プローブをメンブレンから剥離する	31, 122
Time required	所要時間	123
Tips on	Tips(ヒント)	31
Stringency	ストリンジェンシー	24, 28
Stringency washes	ストリンジェンシー洗浄	28
Substrate for alkaline phosphatase,	アルカリホスファターゼ基質	
Chemiluminescent	化学発光基質	29
Chromogenic	発色基質	30
Overview	基質の概要	29

T

Table of procedures	操作の一覧表	7
Tailed oligonucleotide probe	テール付加されたオリゴヌクレオチドプローブ	74
Tailing Kit	Tailing Kit	74
Target nucleic acid,	ターゲット核酸	
Amount required on gel	ゲル上での必要量	19
Concentration of	濃度	87, 97
Degraded	分解された場合	176
Electrophoresis of	電気泳動	19
Fixation to gel	ゲルへの固定	19
Too much	多すぎた場合	103
TE buffer	TEバッファー	46, 183
Telomere	テロメア	142
Telomere length assay	テロメアレングスアッセイ	142
Telomeric DNA	テロメアDNA	142
*Telo**TAGGG* Telomere Length Assay	*Telo**TAGGG* Telomere Length Assay	142
*Telo**TAGGG* Telomere PCR ELISA	*Telo**TAGGG* Telomere PCR ELISA	143
Template,	テンプレート	
Concentration	濃度	11
Contamination in	コンタミネーション	45
Purification,	精製,	
see Purification of Template	*テンプレートの精製*を参照	
Three probes on same blot	同一ブロット上で3種類のプローブを使用する	121
T_{hyb}	T_{hyb}	
Calculating	計算	159
For DNA probes	DNAプローブ用	159
For oligonucleotide probes	オリゴヌクレオチドプローブ用	160
For RNA probes	RNAプローブ用	24, 158
T_m of oligonucleotides	オリゴヌクレオチドのT_m	160
T_m of DNA-DNA hybrid	DNA-DNAハイブリッドのT_m	159
Transcriptional labeling of RNA	RNAのトランスクリプションによるラベリング	62

Transcription vector	トランスクリプションベクター	62
Transfer buffer	トランスファーバッファー	88, 95
Transparancy technique	トランスパランシー法	133
TRF	TRF	145
Troubleshooting for	トラブルシューティング	
PCR labeling	PCRラベリング	59
Random primed labeling	ランダムプライムドラベリング	50
RNA transcriptional labeling	トランスクリプションによるRNAラベリング	71
Two probes on same blot	同一ブロット上で2種類のプローブを使用する	135

U

Unincorporated DIG	取り込まれなかったDIG	103
UV crosslinking	UVクロスリンキング	88, 99

V

Vector, sequences, elimination of	ベクターのシークェンスの除去	46

W

Washes, stringent	ストリンジェンシー洗浄	28, 160
Washing buffer	洗浄バッファー	28, 160
Wash temperature	洗浄の温度	28, 160
Western blot assay, nonradioactive	ノンラジオアクティブな ウェスタンブロットアッセイ	139

X

X-phosphate, *see BCIP*	X-リン酸, *BCIPを参照*	

Y

Yield of labeling probe, estimating	ラベリングされたプローブの収量の概算	75
Yield of labeling probe, For random primed labeling	ランダムプライムドラベリングされたプローブの収量	48

PCRライセンス放棄証明書 (PCR License Disclaimers)

1. 購入者への通知：この製品は, Hoffmann-La Roche Inc.ならびにF. Hoffmann-La Roche Ltd.(Roche)により保護されるポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)への使用のために最適化されています. PCRのプロセスに使用するためにこれらのパテント下のライセンス所有権が, 公然とあるいはこの製品購入に伴う通知により譲渡されることはありません. 特定の研究および開発活動にPCRのプロセスを使用するライセンスには, 公認のサーマルサイクラーあるいはThe Perkin-Elmer Corporationから発売されるサーマルサイクラーの使用と組み合わせた, Roche Molecular Biochemicalsのように認可された供給者からの特定の試薬購入が付随します. PCRのプロセスの実用のためのライセンスの購入に関しては, Director of Licensing at The Perkin-Elmer Corporation, 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404またはRoche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501にコンタクトを取り, 更なる情報を得ることができます.
2. 購入者への通知：Hoffmann-La Roche, Inc.およびF. Hoffmann-La Roche Ltd. ("Roche")が所有するU.S. Patent 4,683,202, 4,683,195, および4,965,188あるいは外国でこれらに相当するライセンスは, 製品に直接的な料金部分(up-front fee component)と連続的な特許権使用料部分(running royalty component)とを有します. その使用が直接的な料金部分により保護されるサーマルサイクラーの使用と組み合わせてこの製品が使用される場合, この製品の購入価格には, 購入者による研究開発活動のみを目的とするとパテント中にうたわれる, ポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)および関連するプロセスを実施するための製品量のみにかかる連続的な特許権使用料部分に基づく限定された譲渡不可の権利を含みます. 直接的な料金部分に対する諸権利は, 完全なライセンスを持つためにエンドユーザーが得るものでなければなりません.
直接的な料金部分に対するこれらの権利はPerkin-Elmerから購入, あるいは公認のサーマルサイクラーの購入により得ることができます. 料金に対する購入者の活動の結果報告に限定のない場合を含むPCRを使用したいかなる種類の営利的なサービスの実施または提供, あるいはその他の営利的な報酬も, 通達または使用停止をもってここにその権利を保証しないものとします. PCRのプロセスを実施するためのライセンス購入に関して, Director of Licensing at The Perkin-Elmer Corporation, 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404またはRoche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501にコンタクトを取り, 更なる情報を得ることができます.

商　標

以下の製品名は，Rocheグループのメンバーの商標です．

Expand	SuRE/Cut
High Pure	Titan
Lumi-Imager	TriPure
Quick Spin	

Atlasは，CLONTECH Laboratories, Inc.の商標です．
CDP-*Star* は，Tropix, Inc.の商標です．
Coomassieは，Imperial Chemical Industries, Ltd.の登録商標です．
CSPDおよびNitro-Blockは，Tropix, Inc.の登録商標です．
Cronexは，E.I. du Pont de Nemours and Co.の登録商標です．
Elutipsは，Schleicher & Schuellの登録商標です．
Nonidetは，Shell International Petroleum Company Limitedの登録商標です．
NuPAGEおよびQuickPointは，NOVEX, Inc.の登録商標です．
Parafilmは，American Can Companyの登録商標です．
Pipetmanは，Gilson Medical Elecronicsの登録商標です．
RNase *AWAY* は，Molecular BioProducts, Inc.の登録商標です．
Sephadexは，Pharmacia ABの登録商標です．
Stratalinkerは，Stratageneの登録商標です．
SYBRは，Molecular Probes, Inc.の登録商標です．
SYPROおよびTexas Redは，Molecular Probes, Inc.の商標です．
Tweenは，Desitin-Werk, Carl Klinke GmbHの登録商標です．

索 引

A

About this manual	このマニュアルについて	6
Additives to DIG System buffers	DIGシステム用バッファーへの添加剤	26
Advantage of		
Alkaline phosphatase substrates	アルカリホスファターゼ基質の利点	29
DIG labeling methds	DIGラベリング法の利点	11
Agarose		
Gel	アガロースゲル	19
Gel DNA Extraction Kit	Gel DNA Extraction Kit	46, 174
MP	MP	35
Air bubble	気泡	130, 169, 179
Alkali-labile probes, stripping	アルカリ感受性プローブの剥離	31, 122
Alkaline phosphatase, inactivation of	アルカリホスファターゼの不活性化	121, 186
Alkaline phosphatase substrates		
Chemiluminescent	アルカリホスファターゼの化学発光基質	29, 107
Chromogenic	アルカリホスファターゼの発色基質	30, 115
Overview	アルカリホスファターゼ基質の概要	29
Sensitivity	アルカリホスファターゼ基質の感度	161
Amount of target nucleic acid		
required	ターゲットとして必要な核酸の量	19
Analysis of PCR labeling	PCRラベリングの解析	57
Anti-DIG	抗DIG抗体	4
Tips on	抗DIG抗体に関するヒント	181
Working dilution of,		
chemiluminescent detection	抗DIG抗体、化学発光検出での希釈率	108
chromogenic detection	抗DIG抗体、発色検出での希釈率	117
Antisense RNA	アンチセンスRNA	62
Application for DIG labeling	DIGラベリングのアプリケーション	40, 138

B

Background		
Irregular, cloudy	不規則で雲様のバックグラウンド	163
Irregular, smeared, grainy	不規則でスメア、粒状のバックグラウンド	164
Nonspecific	非特異的なバックグラウンド	168
On one part of membrane	メンブレンの一部分にバックグラウンド	164
Spotty	スポット状のバックグラウンド	165
Uniform high	全体的に高いバックグラウンド	163
Baking DNA on membrane	メンブレン上のDNAのベーキング	88, 177
BCIP	BCIP	115
Blocking reagent	ブロッキング試薬	4
Blocking solution	ブロッキング溶液	186
Blot	ブロット	21, 84, 175
Membranes, different types of	ブロッティングメンブレンの様々なタイプ	22
Storage of	ブロットの保存	89, 99
Blot transfer		
Advantages of	ブロットトランスファーの利点	21
Blot transfer		
Amount of salt to use	ブロットトランスファーに使用する塩の量	21
Buffers for	ブロットトランスファーバッファー	183, 184
Choosing a method	ブロットトランスファー法の選択	21

Critical hints about	ブロットトランスファーの重要なヒント	103
Diagram of setup	ブロットトランスファーのセットアップの図	88
Methods	ブロットトランスファー法	21
Weight to use	ブロットトランスファーに使用する重り	88
Buffers for		
Blot transfer	ブロットトランスファーバッファー	183, 184
Hybridization	ハイブリダイゼーションバッファー	183, 184

C

Calculation of hybridization temperature	ハイブリダイゼーション温度の計算	159
Capillary transfer	キャピラリートランスファー	21, 87, 177
CDP-*Star*	CDP-*Star*	29
Cell debris	細胞のデブリス	131
Cellulose acetate filtration	セルロースアセテートフィルターろ過	171
Cesium chloride	塩化セシウム	174
Characteristics of blot membranes	ブロッティングメンブレンの特徴	22
Checking PCR labeling	PCRラベリングの確認	57
Chemiluminescent		
Alkaline phosphatase substrate	化学発光アルカリホスファターゼ基質	29
Detection, results	化学発光検出の結果	113
Detection, technique	化学発光検出のテクニック	106
Detection, troubleshooting	化学発光検出のトラブルシューティング	110
Peroxidase substrate	化学発光ペルオキシダーゼ基質	139
Western blot substrate	化学発光ウェスタンブロッティングの基質	139
Choosing a blot transfer method	ブロットトランスファー法の選択	21
Chromogenic		
Alkaline phosphatase substrate	発色アルカリホスファターゼ基質	30
Detection, results	発色検出の結果	121
Detection, tequnique	発色検出のテクニック	115
Chromosomal DNA, interference of	染色体DNAの干渉	46
Cleaning "dirty" probes	不純物を含むプローブをきれいにする	50
Colony hybridization	コロニーハイブリダイゼーション	126
Typical results with	コロニーハイブリダイゼーションの代表的な結果	135
Color substrate	発色基質	115
Comments on DIG labeling methods	DIGラベリング法に対する解説	11
Comparison of		
DNA and RNA probes	DNAプローブとRNAプローブの比較	13
mRNA and total RNA probes	mRNAプローブとトータルRNAプローブの比較	74
PCR DIG Labeling Mix and PCR DIG Probe Synthesis Kit	PCR DIG Labeling Mixと PCR DIG Probe Synthesis Kitの比較	153
Popular labeling methods	汎用される種々のラベリング法の比較	11
Concentration of template	テンプレート濃度	53, 58, 59
Controls, DIG-labeled	DIGラベルされたコントロール	75
CSPD	CSPD	29
Cycler settings for		
PCR labeling	PCRラベリング用のサイクラーの設定	56
Production of RNA labeling template	RNAラベリングテンプレートの生成用のサイクラーの設定	68

D

Deletions, detecting	欠失の検出	146
Denaturation of template	テンプレートの変性	47, 56
Denaturation solution for gels	ゲルの変性溶液	183
Density gradient	密度勾配	46
DEPC	DEPC	184
Depurination	脱プリン	176, 183
Detection buffer	検出バッファー	186
Detection		
Of alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼの検出	29
Of bacterial colonies on a plate	Lumi-Imagerを用いた	
Of deletions	欠失の検出	146
Of digoxigenin	ジゴキシゲニンの検出	29, 106
Of DNA-protein complexes	DNA-タンパク複合体の検出	149
Detection of probe-target		
hybrids	プローブとターゲットとのハイブリッド	29
Chemiluminescent methods	化学発光法によるプローブとターゲットとのハイブリッド	106
Chomogenic methods	発色法によるプローブとターゲットとのハイブリッド	115
Differential mobility of		
DNA-protein complexes	DNA-タンパク複合体の移動度の違い	149
DIG basics	DIGの基礎	156
Summary of	DIGの基礎のまとめ	156〜161
DIG-dUTP to dTTP ratio,		
effects of	DIG-dUTPとdTTPとの比率とその効果	14, 59
DIG-Easy Hyb	DIG-Easy Hyb	26, 104, 158
Amount required for hybridization	ハイブリダイゼーションで必要とされる量	89, 100
DIG Gel Shift Kit	DIG Gel Shift Kit	149
DIG-High Prime Kit	DIG-High Prime Kit	44
DIG-labeled DNA probe,		
storage of	DIGラベルプローブの保存	48, 58, 69
DIG-labeled probe,		
concentration of	DIGラベルプローブの濃度	
DIG labeling, see Labeling	DIGラベリング, ラベリングを参照	158
DIG laboratory,equipping	DIG操作のための実験室の設備	33
DIG Northern Starter Kit	DIG Northern Starter Kit	63
DIG Oligonucleotide Labeling Kits	DIG Oligonucleotide Labeling Kit	74
Digoxigenin	ジゴキシゲニン	3
DIG Product Selection Guide	DIG製品セレクションガイド	36
DIG System,		
General precautions	DIGシステムにおける一般的な注意	174
Improving results	DIGシステムでの結果を改善する	174
Overview	DIGシステムの概要	11
Products ordering information for (Appendix E)	DIGシステム製品のご注文情報（付録 E）	188
Troubleshooting	DIGシステムのトラブルシューティング	162
DIG Tailing Kit	DIG Tailing Kit	74
DIG Wash and Block Buffer Set	DIG Wash and Block Buffer Set	186
Dilution of probe	プローブの希釈	76
Dimethylformamide	ジメチルフォルムアミド	122
"Direct detection assay,		
Overview of	直接検出アッセイの概要	16
Evaluation of	直接検出アッセイの評価	16
Procedure	直接検出アッセイの操作方法	76

Results	直接検出アッセイの結果	17
Serial dilutions for	直接検出アッセイに使用する希釈系列	78, 79, 80
When to use	直接検出アッセイの用途	16
Direct detection of DIG-labeled DNA on a gel	DIGラベルDNAをゲル上で直接検出する	18, 151
Direct labeling with DIG	DIGを用いた直接ラベリング	74
"Dirty" probes, cleaning	不純物を含むプローブをきれいにする	50
DMDC	DMDC	65, 184
DNA molecular weight marker	DNA分子量マーカー	38
DNA-protein complexes	DNA-タンパク複合体	149
DNase I	DNase I	69
Dry membrane, effects of	メンブレンの乾燥による影響	167, 178

E

Effect of DIG labeling on mobility	DIGラベリングが移動度に与える影響	18, 57
Electrophoresis of target nucleic acids	ターゲット核酸の電気泳動	19
Critical hints about	重要な情報	103
Electrostatic charge	静電的な電荷	167
EMSA	EMSA	149
End Labeling Kit	末端ラベリングキット	74
Equipping a DIG laboratory	DIG操作のための実験室の設備	33
Estimation of PCR labeling	PCRラベリングの概算	18, 57
Estimation of probe labeling	プローブラベリングの概算	16, 75
Ethidium bromide staining technique	臭化エチジウムの染色テクニック	19
Ethidium bromide, sensitivity of	臭化エチジウムの感度	19
Exon-intron structure of genes	遺伝子のエクソン-イントロン構造	146
Expand High Fidelity Enzyme Blend	Expand High Fidelity酵素ブレンド	67
Expand Long Template Enzyme Blend	Expand Long Template酵素ブレンド	67
Evaluation of probe labeling	プローブラベリングの評価	57, 75

F

Filtration	ろ過	163
Chemiluminescent detection of probes on a blot	ブロット上のプローブの化学発光検出	107
Chromogenic detection of probes on a blot	ブロット上のプローブの発色検出	117
Colony hybridization	コロニーハイブリダイゼーション	129
Estimation of probe yield	プローブの収量の概算	76
Hybridization of DNA probes to a Southern blot	サザンブロットへのDNAプローブのハイブリダイゼーション	86
Hybridization of RNA probes to a Northern blot	ノーザンブロットへのRNAプローブのハイブリダイゼーション	96
Flow chart for	フローチャート	
Labeling of RNA probes	RNAプローブのラベリング	65
PCR labeling or probes	PCRラベリングまたはプローブ	53
Performing a DIG labeling and detection experiment	DIGラベリングおよび検出実験を行う	7
Plaque hybridization	プラークハイブリダイゼーション	129
Random primed labeling	ランダムプライムドラベリング	45
Forceps	ピンセット	167
Formamide	フォルムアミド	24, 185
Effect on hybridization"	ハイブリダイゼーションに対する作用	24
Formaldehyde	フォルムアルデヒド	20
Four-base cutter	4塩基認識の制限酵素	46
Fragile X	Fragile X	61

G

GC content, effect of	GC含有率の影響	25
Gel electrophoresis of labeled probes	ラベルされたプローブのゲル電気泳動	18, 57
Gel mobility shift assay	ゲルシフトアッセイ	149
Gene rearrangement, detecting	遺伝子の転位(rearrangement)の検出	146
Genomic libraries	ジェノミックライブラリー	125
Glyoxal	グリオキサル	176

H

High background	バックグラウンドが高い	163, 164
High Pure PCR Purification Kit	High Pure PCR Purification Kit	46
High Pure Plasmid Isolation Kit	High Pure Plasmid Isolation Kit	46
High stringency wash	高ストリンジェンシー洗浄	28
High volume screening techniques	大容量スクリーニングのテクニック	125
HNPP	HNPP	5
Hybridization bag	ハイブリダイゼーションバッグ	89, 100
Wrinkles in	バッグにしわが入ると…	164
Hybridization		
Buffers	ハイブリダイゼーションバッファー	25
Probe, *see Probe, hybridization*	*プローブ, プローブ, ハイブリダイゼーションを参照*	
Sequence, influence of	シークェンスの作用	25
Hybridization solution	ハイブリダイゼーション溶液	25
Amount to use	使用量	89, 100
Insufficient	溶液が不充分だと…	165
Hybridization techniques	ハイブリダイゼーションのテクニック	
Amount of DNA probe required	DNAプローブの必要量	75〜84
Amount of RNA probe required	RNAプローブの必要量	75〜84
Critical hints about	テクニックに関する重要なヒント	103, 104
For colony/plaque lifts	コロニー/プラークリフトの検出	126
For DNA probes and DNA targets	DNAプローブを用いたDNAターゲットの検出	84
For DNA probes and RNA targets	DNAプローブを用いたRNAターゲットの検出	102
For oligonucleotide probes and DNA targets	オリゴヌクレオチドプローブを用いたDNAターゲットの検出	93
For RNA probes and RNA targets	RNAプローブを用いたRNAターゲットの検出	94
Importance of sealed containers	密閉容器の重要性	178
Mock	モック	172
Overview	概要	23
Temperature required	必要とされる温度	24
Hybridization techniques	ハイブリダイゼーションのテクニック	
Time required	所要時間	27
Transparancy techniqu	トランスパランシーテクニック	133
Troubleshooting	トラブルシューティング	105
Use of plastic wrap	プラスチック製ラップを使用すると…	89, 100
Hybridization temperature, Optimal	ハイブリダイゼーション温度, 最適温度	159

I

Insertions, detecting	挿入(insertion)の検出	146
In situ hybridization	*in situ* ハイブリダイゼーション	4
Internal control RNA	インターナルコントロールRNA	146
Intron-exon structure of genes	遺伝子のイントロン-エクソン構造	146
In vitro transcription	*in vitro*トランスクリプション	14

K

Klenow	クレノー酵素	14

L

Labeled probe, yield of,	ラベルされたプローブの収量,	
see Yield or labeled probe	*収量またはラベルされたプローブを参照*	
Labeling	ラベリング	
By PCR	PCRによる	51
By randam primed method	ランダムプライムド法による	43
Direct	直接法による	74
Methods	ラベリング法	11
Of oligonucleotide	オリゴヌクレオチドを対象	73
Of RNA by transcription	トランスクリプションによるRNAを対象	62
Overview	ラベリングの概要	11
Sensitivity of	ラベリングとプローブの感度	11
Template requirements	ラベリングに必要なテンプレート	11
Laboratory equipment for DIG	DIG操作のための実験室の設備	
labeling and detection	ラベリングおよび検出	33
Lifts, colony/plaque	コロニー/プラークリフト	126
List of procedures	操作方法のリスト	7
Low labeling efficiency	ラベリング効率が低い	50, 59, 71
Low stringency wash	低ストリンジェンシー洗浄	28
Lumi-Film	Lumi-Film	107
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Lumi-Light Western Blotting Substrate	139
Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Kit	Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Kit	139
Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Substrate	Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Substrate	139

M

Maleic Acid Buffer	マレイン酸バッファー	186
Magnesium ions	マグネシウムイオン	165
Mapping transcriptional start sites	転写開始部位のマッピング	146
Mapping transcriptional termination sites	転写終止部位のマッピング	146
Maxi-preps	マキシ-プレップ	46
Membrane		
Diffuse bands on	メンブレン上でバンドが拡散した	168
Letting dry out	メンブレンを乾燥させた	163
Missing bands on	メンブレン上のバンドが失われた	169
Problems with background,	メンブレンのバックグラウンドに関する問題,	
see Background	*バックグラウンドを参照*	
Reprobing	メンブレンのリプロービング	31, 122
Salt crystals on	メンブレン上に塩結晶が析出した	166
Stripping	メンブレンからのプローブの剥離	31, 122
Unsuitable	メンブレンの不適切なタイプ	166
Methods for DIG labeling	DIGラベリングの方法	11
Mini-preps	ミニ-プレップ	46
Mock hybridization	モックハイブリダイゼーション	172
Molecular weight marker	分子量マーカー	38
MOPS	MOPS	20, 185
mRNA, detection of rare	発現量の少ないmRNAの検出	113
mRNA Isolation Kit	mRNA Isolation Kit	75

N

NBT/BCIP	NBT/BCIP	5, 115
Neutralization of gels	ゲルの中和	87, 183
NGF mRNA	NGF由来mRNA	113
Nick Translation	ニックトランスレーション	4
Nonradioactive	ノンラジオアクティブ法による	
Detection of PCR production ona gel	PCR産物のゲル上での検出	18, 57

Gel mobility shift assay	ゲルシフトアッセイ	149
RNase protection assay	RNaseプロテクションアッセイ	146
Telomerase length assay	テロメラーゼレングスアッセイ	142
Western blot assay	ウェスタンブロットアッセイ	139
Northern blot	ノーザンブロット	94
Kits for	ノーザンブロットのためのキット	63
N-RAS	N-RAS	121
Nucleic acids,	核酸,	
see Target nucleic acids	*ターゲット核酸を参照*	
Nylon membrane for colony/ plaque hybridization	コロニー/プラークハイブリダイゼーション用 ナイロンメンブレン	126
Nylon membrane, positively charged	ナイロンメンブレンポジティブチャージ	22

O

Oct2A	Oct2A	151
Oligonucleotide	オリゴヌクレオチド	
Calculation of amount	量の計算	74
Labeling	ラベリング	73
Probes, Sensitivity of	プローブの感度	74
Optimal hybridization temperature	ハイブリダイゼーションの最適温度	158
Optimizing PCR	PCRの最適化	58
Overview of DIG labeling methods	DIGラベリング法の概要	11

P

PCR DIG Labeling Mix	PCR DIG Labeling Mix	151
Comparison with PCR DIG Probe Synthesis Kit	PCR DIG Probe Synthesis Kitとの比較	153
Sensitivity of	PCR DIG Labeling Mixの感度	153
PCR DIG Probe Synthesis Kit	PCR DIG Probe Synthesis Kit	52
Comparison with PCR DIG Labeling Mix	PCR DIG Labeling Mixとの比較	153
PCR labeling	PCRラベリング	202
Critical hints about	重要なヒント	58
Troubleshooting for	トラブルシューティング	59
Typical result with	代表的な結果	61
PFGE	PFGE	20
Plaque hybridization	プラークハイブリダイゼーション	126
Plasmid purification	プラスミドの精製	46
Plastic	プラスチック	
Film	フィルム	133
Tranparancy	トランスパランシー	133
Wrap, problems with	ラップの使用による問題	164
Polylinker	ポリリンカー	175
Popular DIG labeling methods	汎用されるDIGラベリング法	13
Prehybridization	プレハイブリダイゼーション	178
Pretreatment of gel before blot transfer	ブロットトランスファーの前にゲルを処理する	176
Prewarming wash buffers	洗浄用バッファーを予め温める	181
Probe, hybridization	プローブのハイブリダイゼーション	
Concentration during hybridization	ハイブリダイゼーション中でのプローブ濃度	23
Denaturation of	変性	104
Effects of too little	少なすぎる場合の影響	172
Effects of too much	多すぎる場合の影響	163
Filtration of	フィルターろ過	178
Homology with target	ターゲットとのホモロジー	159
Labeling, estimation of	ラベリングの概算	75

Labeling, yield of, see *Yield of labeled probe* — ラベリングの収量, *ラベルされたプローブの収量を参照*
Uneven distribution of — 不均一に拡散した 165
Problems with background, see *Background* — バックグラウンドによる問題, *バックグラウンドを参照*
Procedures, list of — 操作方法のリスト 7
Proteinase K — プロティナーゼK 175
Pulse field gel electrophoresis — パルスフィールドゲル電気泳動 20
Purification of template — テンプレートの精製
For PCR labeling — PCRラベリング用テンプレート 54
For randam primed labeling — ランダムプライムドラベリング用テンプレート 45
For RNA transcriptional labeling — トランスクリプションによるRNAラベリング用テンプレート 66

Q

Quantification — 定量
Of labeled probe — ラベルされたプローブ 75

R

Rainbow detection — レインボー検出 121
Random primed labeling technique — ランダムプライムドラベリングのテクニック 43
Critical hints about — 重要なヒント 49
Troubleshooting for — トラブルシューティング 50
Typical results with — 代表的な結果 173
Rapid DNA Ligation Kit — Rapid DNA Ligation Kit 66
Reagents for DIG System (Appendix E) — DIGシステムに使用する試薬(付録E) 188
Reprobing membrane — メンブレンのリプロービング 31, 122
Reverse transcriptase — 逆転写酵素(リバーストランスクリプターゼ) 64, 67
Roller bottle — ローラーボトル 163, 179
RNA, alkali treatment of — RNAのアルカリ処理 98
RNA electrophoresis — RNAの電気泳動 20, 97
RNA labeling — RNAラベリング 62
Critical hints about — 重要なヒント 70
Troubleshooting for — トラブルシューティング 71
Typical results with — 代表的な結果 72
RNA loading buffer — RNAローディングバッファー 95, 185
RNA polymerases — RNAポリメラーゼ 62
Promoter sequences for — プロモーターシークェンス 62
RNA, separating on gels — RNAのゲル分離 20, 97
RNase
contamination, preventing — RNaseのコンタミネーションを防ぐ 70, 180
Protection assay — RNaseプロテクションアッセイ 146
Protection Kit — RNase Protection Kit 146
T1 — RNase T1 146
rRNA signals on blot, unwanted — rRNAによる不要なシグナルがブロット上に現れた169

S

Salt crystals on membrane — 塩結晶がメンブレン上に析出した 166
Salt for blot transfer, amount to use — ブロットトランスファーに使用する塩の量 21
"Sandwich", blot transfer — 「サンドイッチ」ブロットトランスファー 88, 98
Screening colonies and plaques — コロニーおよびプラークのスクリーニング 126
Sensitivity — 感度
Of DIG labeling — DIGラベリング 11
Of DNA and RNA probes, comparison — DNAプローブとRNAプローブとの比較 15
Of oligonucleotide probes — オリゴヌクレオチドプローブ 12

Separation of DNA on a gel	DNAのゲル分離	19, 87
Separation of RNA on a gel	RNAのゲル分離	20, 97
Serial dilutions	希釈系列	122
Single gene detection, optimization of	シングルコピー遺伝子検出の最適化	171
Southern blot	サザンブロット	84
Diagram of setup	セットアップの図	88
Spotting probe on membrane	プローブをメンブレン上で検出する	16, 75
Stability of DIG-labeled DNA probe	DIGラベルDNAプローブの安定性	2
Stop buffer	ストップバッファー(反応停止用バッファー)	65
Storage	保存方法	
Of DNA probe	DNAプローブ	48, 58
Of membrane	メンブレン	93, 99
Of RNA probe	RNAプローブ	69, 70
Stripping buffer	プローブ剥離バッファー	122
Stripping of membrane	プローブをメンブレンから剥離する	31, 122
Time required	所要時間	123
Tips on	Tips(ヒント)	31
Stringency	ストリンジェンシー	24, 28
Stringency washes	ストリンジェンシー洗浄	28
Substrate for alkaline phosphatase,	アルカリホスファターゼ基質	
Chemiluminescent	化学発光基質	29
Chromogenic	発色基質	30
Overview	基質の概要	29

T

Table of procedures	操作の一覧表	7
Tailed oligonucleotide probe	テール付加されたオリゴヌクレオチドプローブ	74
Tailing Kit	Tailing Kit	74
Target nucleic acid,	ターゲット核酸	
Amount required on gel	ゲル上での必要量	19
Concentration of	濃度	87, 97
Degraded	分解された場合	176
Electrophoresis of	電気泳動	19
Fixation to gel	ゲルへの固定	19
Too much	多すぎた場合	103
TE buffer	TEバッファー	46, 183
Telomere	テロメア	142
Telomere length assay	テロメアレングスアッセイ	142
Telomeric DNA	テロメアDNA	142
*Telo**TAGGG* Telomere Length Assay	*Telo**TAGGG* Telomere Length Assay	142
*Telo**TAGGG* Telomere PCR ELISA	*Telo**TAGGG* Telomere PCR ELISA	143
Template,	テンプレート	
Concentration	濃度	11
Contamination in	コンタミネーション	45
Purification,	精製,	
see Purification of Template	*テンプレートの精製*を参照	
Three probes on same blot	同一ブロット上で3種類のプローブを使用する	121
T_{hyb}	T_{hyb}	
Calculating	計算	159
For DNA probes	DNAプローブ用	159
For oligonucleotide probes	オリゴヌクレオチドプローブ用	160
For RNA probes	RNAプローブ用	24, 158
T_m of oligonucleotides	オリゴヌクレオチドのT_m	160
T_m of DNA-DNA hybrid	DNA-DNAハイブリッドのT_m	159
Transcriptional labeling of RNA	RNAのトランスクリプションによるラベリング	62

Transcription vector	トランスクリプションベクター	62
Transfer buffer	トランスファーバッファー	88, 95
Transparancy technique	トランスパランシー法	133
TRF	TRF	145
Troubleshooting for	トラブルシューティング	
PCR labeling	PCRラベリング	59
Random primed labeling	ランダムプライムドラベリング	50
RNA transcriptional labeling	トランスクリプションによるRNAラベリング	71
Two probes on same blot	同一ブロット上で2種類のプローブを使用する	135

U

Unincorporated DIG	取り込まれなかったDIG	103
UV crosslinking	UVクロスリンキング	88, 99

V

Vector, sequences, elimination of	ベクターのシークェンスの除去	46

W

Washes, stringent	ストリンジェンシー洗浄	28, 160
Washing buffer	洗浄バッファー	28, 160
Wash temperature	洗浄の温度	28, 160
Western blot assay, nonradioactive	ノンラジオアクティブな ウェスタンブロットアッセイ	139

X

X-phosphate, *see BCIP*	X-リン酸, *BCIPを参照*	

Y

Yield of labeling probe, estimating	ラベリングされたプローブの収量の概算	75
Yield of labeling probe, For random primed labeling	ランダムプライムドラベリングされたプローブの収量	48

PCRライセンス放棄証明書 (PCR License Disclaimers)

1. 購入者への通知：この製品は, Hoffmann-La Roche Inc.ならびにF. Hoffmann-La Roche Ltd.(Roche)により保護されるポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)への使用のために最適化されています. PCRのプロセスに使用するためにこれらのパテント下のライセンス所有権が, 公然とあるいはこの製品購入に伴う通知により譲渡されることはありません. 特定の研究および開発活動にPCRのプロセスを使用するライセンスには, 公認のサーマルサイクラーあるいはThe Perkin-Elmer Corporationから発売されるサーマルサイクラーの使用と組み合わせた, Roche Molecular Biochemicalsのように認可された供給者からの特定の試薬購入が付随します. PCRのプロセスの実用のためのライセンスの購入に関しては, Director of Licensing at The Perkin-Elmer Corporation, 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404またはRoche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501にコンタクトを取り, 更なる情報を得ることができます.
2. 購入者への通知：Hoffmann-La Roche, Inc.およびF. Hoffmann-La Roche Ltd. ("Roche")が所有するU.S. Patent 4,683,202, 4,683,195, および4,965,188あるいは外国でこれらに相当するライセンスは, 製品に直接的な料金部分(up-front fee component)と連続的な特許権使用料部分(running royalty component)とを有します. その使用が直接的な料金部分により保護されるサーマルサイクラーの使用と組み合わせてこの製品が使用される場合, この製品の購入価格には, 購入者による研究開発活動のみを目的とするとパテント中にうたわれる, ポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)および関連するプロセスを実施するための製品量のみにかかる連続的な特許権使用料部分に基づく限定された譲渡不可の権利を含みます. 直接的な料金部分に対する諸権利は, 完全なライセンスを持つためにエンドユーザーが得るものでなければなりません.
直接的な料金部分に対するこれらの権利はPerkin-Elmerから購入, あるいは公認のサーマルサイクラーの購入により得ることができます. 料金に対する購入者の活動の結果報告に限定のない場合を含むPCRを使用したいかなる種類の営利的なサービスの実施または提供, あるいはその他の営利的な報酬も, 通達または使用停止をもってここにその権利を保証しないものとします. PCRのプロセスを実施するためのライセンス購入に関して, Director of Licensing at The Perkin-Elmer Corporation, 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404またはRoche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501にコンタクトを取り, 更なる情報を得ることができます.

商　標

以下の製品名は，Rocheグループのメンバーの商標です.

Expand	SuRE/Cut
High Pure	Titan
Lumi-Imager	TriPure
Quick Spin	

Atlasは，CLONTECH Laboratories, Inc.の商標です.
CDP-*Star* は，Tropix, Inc.の商標です.
Coomassieは，Imperial Chemical Industries, Ltd.の登録商標です.
CSPDおよびNitro-Blockは，Tropix, Inc.の登録商標です.
Cronexは，E.I. du Pont de Nemours and Co.の登録商標です.
Elutipsは，Schleicher & Schuellの登録商標です.
Nonidetは，Shell International Petroleum Company Limitedの登録商標です.
NuPAGEおよびQuickPointは，NOVEX, Inc.の登録商標です.
Parafilmは，American Can Companyの登録商標です.
Pipetmanは，Gilson Medical Elecronicsの登録商標です.
RNase *AWAY* は，Molecular BioProducts, Inc.の登録商標です.
Sephadexは，Pharmacia ABの登録商標です.
Stratalinkerは，Stratageneの登録商標です.
SYBRは，Molecular Probes, Inc.の登録商標です.
SYPROおよびTexas Redは，Molecular Probes, Inc.の商標です.
Tweenは，Desitin-Werk, Carl Klinke GmbHの登録商標です.